

ANNEE 2004

N°

MEMOIRE
DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury interrégional
le 1^{er} Avril 2004
par Mlle DELAGARDE Virginie

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 10 Septembre 1990 tient lieu de :

THESE
POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

METHODES DE DOSAGE DE LA TROPONINE I
CARDIAQUE

PROBLEMES DE COMPARAISON ET D'INTERPRETATION

Président : Monsieur Alain PINEAU Professeur de Toxicologie
Membres du Jury : Monsieur Khaled MEFLAH Professeur de Biochimie Générale
Monsieur Jean-Luc ORSONNEAU Praticien Hospitalier
Madame Edith BIGOT-CORBEL Maître de Conférences de
Biochimie Générale

A Monsieur le Professeur A.PINEAU,

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter
la présidence de cette thèse.
Nous vous prions d'accepter ici nos sincères
remerciements et l'expression de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur K.MEFLAH,

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse.
Nous vous témoignons ici notre profond respect et
notre sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur J.-L. ORSONNEAU,

Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez
témoignée en nous proposant ce travail.
Nous vous remercions de vos précieux conseils et nous
vous témoignons notre profonde gratitude pour votre
extrême gentillesse et votre patience sans limite.

A Madame le Docteur E.BIGOT-CORBEL,

Nous te sommes reconnaissante d'avoir bien voulu
siéger dans ce jury de thèse.
Accepte ici l'expression de mes remerciements
pour ton attention soutenue à ce travail.

Au personnel du Laboratoire de Biochimie de l'Hôtel Dieu de Nantes,

Qui grâce à ses sourires et son accueil chaleureux
nous a toujours encouragée.
Avec mes sincères remerciements.

Merci aux Laboratoires Bekman-Coulter, Brahms et Diasorin pour avoir mis à notre
disposition appareils et réactifs afin de réaliser ces dosages.

A ma famille et à mes amis.

A mes parents qui m'ont permis de mener à bien mes études, maîtresse de mes orientations ; avec tout mon Amour.

A Matthieu, pour avoir été le catalyseur de ce travail sur ordinateur, et surtout pour tout ce qui nous unit.

A Franck, pour sa présence à mes côtés malgré les sautes d'humeur.

A Hubert, Bertrand, Lisa, Concept Plastic, qui ont su me tirer chaque fois de mes « impasses » informatiques.

A Madame Ruffin-Trichereau et à Madame Graillet, pour m'avoir aménagé un emploi du temps compatible avec cet aboutissement et pour leurs encouragements quotidiens.

Aux techniciennes du Laboratoire Ruffin, pour leur énergie et leur soutien.

Aux Ecuries de l'Epinay, à nos moments de détente.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p.11
<u>1^{ère}</u> partie - RAPPELS CLINIQUES ET BIOLOGIQUES	p.14
A / Rappels cliniques : Maladies coronariennes	p.15
I - Infarctus du myocarde (IDM)	p.15
1) Définition anatomique	p.15
2) Définition diagnostique	p.16
3) Nouvelle définition de l'A.C.C. et de l'E.S.C.	p.16
II - Autres syndromes coronaires	p.17
1) Définitions	p.17
a) Angine de poitrine	p.17
b) Angor instable	p.17
2) Classification clinique de l'angor instable	p.17
a) Braunwald, 1989	p.17
b) Pathogénèse des atteintes coronaires	p.18
c) Facteurs de risque	p.20
d) Hamm et Braunwald, 2000	p.20
e) Recommandations N.A.C.B.	p.20
B / Rappels biologiques : marqueurs biologiques de la nécrose myocardique	p.21
I – Introduction	p.21
1) Les marqueurs	p.21
2) Cinétique d'apparition dans la circulation sanguine	p.22
3) Cardiospécificité- Marqueur idéal	p.22
II – Historique	p.23
III - Marqueurs enzymatiques non-spécifiques	p.24
1) A.S.A.T. : Aspartate aminotransférase	p.24
a) Rôle physiologique et localisation	p.24
b) Mesure de l'activité- Valeurs usuelles	p.24
c) Cinétique et intérêt clinique	p.25
2) L.D.H. : Lactate deshydrogénase	p.25
a) Rôle physiologique et structure	p.25
b) Mesure de l'activité- Valeurs usuelles	p.26
c) Cinétique et intérêt clinique	p.27
3) C.K. : Créatine kinase	p.27
a) Rôle physiologique et structure	p.27
b) Mesure de l'activité- Valeurs usuelles	p.27
c) Cinétique et intérêt clinique	p.28

IV – Myoglobine	p.28
a) Rôle physiologique et structure	p.28
b) Dosage- Valeurs usuelles	p.29
c) Cinétique et intérêt diagnostique	p.30
V - CK-MB : Isoenzyme MB de la créatine kinase	p.31
1) Structure- Localisation	p.31
2) Méthodes de dosage	p.31
a) Mesure de l'activité par immunoinhibition	p.32
b) Mesure de la masse par immunoanalyse	p.33
3) Valeurs usuelles	p.34
4) Cinétique et intérêt clinique	p.34
VI - Le complexe des troponines	p.35
A - Structure et fonction	p.35
1) La contraction musculaire	p.35
2) Les 3 sous-unités du complexe des troponines	p.36
a) Troponine C (TNC)	p.37
b) Troponine T (TNT)	p.38
c) Troponine I (TNI)	p.38
B - Intérêt du dosage des troponines I et T	p.40
1) Introduction : deux seuils décisionnels	p.40
2) Diagnostic de l'IDM	p.41
a) Diagnostic précoce de l'IDM	p.41
b) Diagnostic de certitude de l'IDM	p.41
c) Diagnostic rétrospectif de l'IDM	p.42
3) Diagnostic de la reperfusion après thrombolyse	p.42
4) Appréciation de la taille de l'infarctus	p.43
5) Diagnostic de lésions myocardiques minimales- Angor instable	p.44
6) Atteintes musculaires	p.44
7) Insuffisance rénale	p.44
8) Autres pathologies	p.45
VII - Les nouveaux marqueurs	p.46
1) Protéines de l'inflammation	p.46
2) L'activation des plaquettes	p.46
3) Les marqueurs de thrombose	p.46
4) La GPBB (isoenzyme BB de la glycogène phosphorylase)	p.47
5) Le BNP (Brain natriuretic peptide)	p.47
6) La H-FABPc (Heart type cytoplasmic fatty acid binding protein)	p.47
7) La TPp (Thrombus precursor protein)	p.48
8) Les chaînes légères et chaînes lourdes de la myosine	p.48
9) L'IMA (Ischemia modified albumin)	p.49
a) Historique	p.49
b) Structure	p.49

c) Mécanisme d'action	p.50
d) Principe du dosage : ACB test	p.51
e) Intérêt clinique	p.51
10) La PAPP-A (Pregnancy-associated plasma protein A)	p.52
<u>2^{ème} partie</u> : METHODES DE DOSAGE DES TROPONINES I et T	p.53
I - Généralités : diverses méthodes sur le marché	p.54
II - Méthode de dosage et cinétique de la TNT	p.55
1) ELECSYS® : méthode Roche	p.55
2) Cinétique	p.57
III- Méthodes de dosage de la TNI	p.57
1) ACCESS® : méthode Sanofi Diagnostics Pasteur	p.57
2) AXSYM® system : méthode Abbott	p.59
3) IMMULITE® : méthode DPC	p.61
4) ACS-180® : méthode Bayer Diagnostics	p.63
5) DIMENSION RxL-HM® : méthode Dade Behring	p.64
6) VITROS Eci® : méthode Ortho Clinical Diagnostics	p.66
7) KRYPTOR® : méthode Brahms	p.68
8) LIAISON® : méthode Diasorin	p.70
9) VIDAS® : méthode Biomérieux	p.71
10) AIA System® : méthode Tosoh	p.74
<u>3^{ème} partie</u> : ETUDE PERSONNELLE	p.77
I -Matériel et méthodes	p.78
1) Patients	p.78
2) Techniques de dosage	p.79
II –Résultats	p.79
1) Résultats globaux	p.79
2) Patients victimes d'I.D.M.	p.80
3) Angor et IDM	p.82
4) Cardiopathies non-ischémiques et affections pulmonaires aiguës	p.83
5) Autres pathologies	p.85
III-Discussion	p.85
CONCLUSION	p.87

LISTE DES FIGURES

1. Modifications de l'ECG au cours de l'IDM	p.15
2. Cinétique d'apparition des principaux marqueurs cardiaques	p.23
3. Schéma réactionnel du dosage de la myoglobine sur ACCESS®	p.29
4. Principe du dosage de la CK-MB par immunoinhibition	p.32
5. Principe du dosage de la CK-MB par enzymoimmunométrie	p.33
6. Schéma du complexe des troponines	p.36
7. Structure de la fibre musculaire cardiaque	p.37
8. Mécanisme de la modification de l'albumine par l'ischémie	p.50
9. Principe général du dosage de la troponine	p.54
10. Principe du dosage de la troponine T sur ELECSYS® (Roche)	p.56
11. Principe du dosage de la troponine I sur ACCESS® (Beckman Coulter)	p.58
12. Principe du dosage de la troponine I sur AXSYM® (Abbott)	p.60
13. Principe du lavage par centrifugation axiale sur IMMULITE®	p.61
14. Principe de la réaction de chimiluminescence de l'IMMULITE® (DPC)	p.62
15. Principe du dosage de la troponine I sur ACS :180® (Bayer Diagnostics)	p.63
16. Schéma du module hétérogène du système DIMENSION RXL® (Dade)	p.65
17. Principe du dosage de la troponine I sur VITROS ECI® Ortho Diagnostics)	p.67
18. Schéma du principe de la technologie TRACE	p.68
19. Principe du dosage de la troponine I sur KRYPTOR® (Brahms)	p.69
20. Principe du dosage de la troponine I sur LIAISON® (Diasorin)	p.70
21. Principe du dosage de la troponine I sur VIDAS® (Biomérieux)	p.72
22. Schéma de la cartouche analytique du VIDAS® (Biomérieux)	p.73

LISTE DES TABLEAUX

I- Caractéristiques des principaux marqueurs cardiaques	p.23
II- Synthèse des caractéristiques des systèmes proposés pour le dosage de la troponine I	p.76

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	: Anticorps
ACC	: American College of Cardiology
ADN (DNA)	: Acide désoxyribonucléique
ADP	: Adénosine diphosphate
Ag	: Antigène
ALAT (TGP)	: Alanine aminotransférase (Transaminase glutamate pyruvate)
ASAT (TGO)	: Aspartate aminotransférase (Transaminase glutamate oxaloacétate)
ATP	: Adénosine triphosphate
CRP	: C-réactive protéine
CK	: Créatine kinase
CK-MB (MM, BB)	: Isoenzyme MB (MM, BB) de la créatine kinase
ECG	: Electrocardiogramme
ECLIA	: Electrochimiluminescence immunoassay
ELFA	: Electroluminescent fluorescence assay
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
ESC	: European Society of Cardiology
FAD(P)	: Flavine adenine dinucléotide (phosphate)
FDA	: Food and Drug Administration
HAMA	: Human anti-murin anticorps
IEMA	: Immunoenzymométrique assay
IDM	: Infarctus du myocarde
IFCC	: International Federation of Chemical Chemistry
IMA	: Ischemia modified albumin
IR	: Index relatif
LDH	: Lactate déshydrogénase
MEIA	: Microparticle enzyme immunoassay
NABC	: Académie Nationale de Biochimie Clinique
NAD(P)	: Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
OMS (WHO)	: Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organisation)
ROC	: Receiver Operating Characteristic
TIMI	: Thrombolysis in myocardial infarction
TNC	: Troponine C
TNI(c)	: Troponine I (cardiaque)
TNT(c)	: Troponine T (cardiaque)
TRACE	: Time resolved amplified emission
URL	: Upper reference limit

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Bien que la mortalité induite par les maladies cardiovasculaires ait diminué de 25 % sur les dix dernières années, celles-ci restent le problème de santé le plus important dans les pays industrialisés et la principale cause de mortalité chez les hommes comme chez les femmes.

Leur prévalence est estimée à 2,4 % pour une population au-dessus de l'âge de trente ans dans le monde occidental. L'incidence est d'environ 800 nouveaux cas par million et par an. Si l'hypertension est le type de maladie cardiovasculaire le plus répandu, l'infarctus du myocarde (IDM) est la cause de mortalité la plus fréquente (plus de 300.000 morts aux USA chaque année, 32000 en France).

En outre, leur impact économique est loin d'être négligeable.

Pour concilier l'exigence d'efficacité thérapeutique avec les impératifs d'économie de la santé, les cliniciens confrontés à la présence de patients présentant une douleur thoracique doivent identifier rapidement la cause des symptômes, bien évaluer le risque, et initialiser un traitement adéquat. Les décisions sur la conduite à tenir et le choix des options thérapeutiques ne sont pas toujours faciles. De mauvaises décisions peuvent être dramatiques pour les patients, en termes de morbidité et de mortalité, et avoir des incidences coûteuses sur le système de santé. En effet, un traitement fibrinolytique instauré dans les 6 heures qui suivent le début de l'infarctus du myocarde limite la morbidité mais coûte très cher, d'où la nécessité de disposer d'outils biologiques pour le diagnostic.

Dans cette perspective, les troponines cardiaques (I ou T) se sont imposées par leur sensibilité et leur spécificité pratiquement absolue dans l'exploration des affections cardiaques. Si elles font désormais partie de la définition de l'infarctus du myocarde, l'élévation de leur taux sanguin peut également être le reflet de lésions d'origines autres qu'ischémiques : infectieuses, traumatiques, toxiques, congestives...

La troponine I est aujourd'hui de loin la plus utilisée du fait notamment de la multiplicité des fournisseurs, engendrant une littérature très abondante sur le sujet ; mais la comparaison des différentes offres réserve parfois quelques surprises. Compte tenu de ses caractéristiques structurales (sites de phosphorylation, possibilité de pont

disulfure, sensibilité à la protéolyse) et de son appartenance physiologique à un complexe ternaire (troponines C, I et T), elle se retrouve, en cas d'atteinte cardiaque, relarguée dans la circulation sous différentes formes. Ces diverses formes peuvent elles-même évoluer en fonction du temps et de la nature des lésions. Il découle de tout cela que selon les anticorps utilisés pour le dosage, les épitopes contre lesquels ils sont dirigés, et le matériel utilisé pour le calibrage, il n'est pas surprenant d'observer des écarts entre les différentes trousse disponibles commercialement.

Pour illustrer cela, nous avons choisi de comparer les résultats obtenus habituellement au laboratoire à ceux de deux méthodes encore peu rencontrées dans la littérature et de commercialisation relativement récente.

1^{ère} partie :

RAPPELS CLINIQUES ET BIOLOGIQUES

1^{ère} partie : RAPPELS CLINIQUES ET BIOLOGIQUES

A/ RAPPELS CLINIQUES : MALADIES CORONARIENNES

Les maladies coronariennes comprennent un large éventail d'états pathologiques, variant de l'angine de poitrine chronique stable à l'IDM.

I - Infarctus du Myocarde : IDM

1) Définition anatomique

L'infarctus myocardique est une lésion anatomique correspondant à une nécrose massive et systématisée, d'origine ischémique, du muscle cardiaque dont l'étendue dépasse 2,5 cm². Cette définition élimine les nécroses focales disséminées de petite taille et sous-entend la participation d'anomalies du réseau coronaire (interruption du flux artériel par occlusion coronarienne) où athérosclérose et thrombose jouent un rôle quasi exclusif (LOIRE, 1987).

- Infarctus transmural ou infarctus à onde Q

L'infarctus transmural atteint toute l'épaisseur du myocarde, de l'épicarde à l'endocarde, et est caractérisé par la présence d'ondes Q pathologiques à l'électrocardiogramme (ECG) (Complexe QS) (BERKOW, 1994).

- Infarctus non-transmural ou infarctus sans onde Q

L'infarctus non-transmural ne traverse pas la paroi ventriculaire et ne provoque que des anomalies du Segment ST et de l'onde T (BERKOW, 1994).

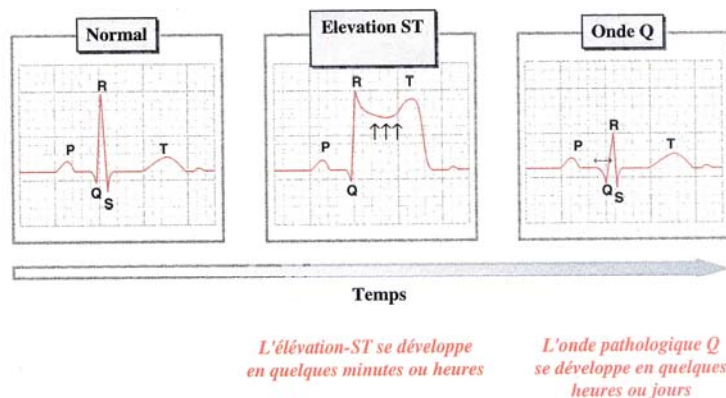


Figure 1 : modifications de l'ECG au cours d'un IDM

- Infarctus rudimentaire :

Il correspond à des lésions de nécrose intra-murale ou sous-endocardique de faible étendue.

- Infarctus sous-endocardique :

Il correspond à des lésions ou nécroses limitées dans leur extension en épaisseur mais importantes par leur extension sous-endocardique.

2) Définition diagnostique de l'IDM

Suivant la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, le diagnostic d'IDM requiert au moins deux des trois critères suivants :

- Une histoire clinique du patient avec douleurs thoraciques caractéristiques pendant au moins vingt minutes.

Cette douleur est le plus souvent brutale, rétrosternale constrictive, et survient généralement au repos avec de larges irradiations vers le cou, la mâchoire et les membres supérieurs. Elle est résistante à la trinitrine.

- Des changements évolutifs dans l'Electrocardiogramme. (Cf page précédente : § ECG)

- Des marqueurs cardiaques augmentés telles que l'isoenzyme MB de la Créatine Kinase et plus récemment des protéines cardiaques telles que les troponines I ou T.

3) Nouvelle définition de l'ACC (American College of Cardiology) et de l'ESC (European Society of Cardiology)

Plus récemment, avec l'utilisation de méthodes de dosage très sensibles de la Troponine, il a été montré que des dommages ischémiques cellulaires n'apparaissent pas seulement au cours de l'infarctus du myocarde, comme le définissent les critères de l'OMS, mais aussi à des stades plus précoces du syndrome coronarien.

Même les petites quantités de Troponine détectées dans le sang sont liées à un risque accru de mortalité ou de morbidité chez le patient.

Dans un document de consensus commun, l'European Society of Cardiology (ESC) et l'American College of Cardiology (ACC) ont décidé que : “toute

augmentation de la Troponine, définie comme la mesure dépassant le 99^{ème} percentile d'un groupe de contrôle de référence (et en présence de preuves cliniques d'ischémie) peut être étiquetée comme infarctus du myocarde (même minime)" (ALPERT *et al*, 2000).

Dorénavant, la troponine I ou T constitue la pierre angulaire du diagnostic de l'IDM.

II - Autres Syndromes coronaires

1) Définitions

a) **L'angine de poitrine** : L'angor stable est un syndrome clinique dû à l'ischémie myocardique et caractérisé par des épisodes de gêne ou d'oppression précordiale, déclenchés classiquement par l'effort et soulagés par le repos ou l'administration de nitroglycérine (BERKOW, 1994).

b) **L'angor instable** est défini par son caractère évolutif. La douleur ou la gêne de l'angine de poitrine peuvent être plus intenses, durer plus longtemps, être provoquées par moins d'effort, ou survenir spontanément au repos, ou toutes les combinaisons de ces modifications peuvent être présentes (BERKOW, 1994).

C'est un syndrome hétérogène où l'on peut trouver une grande variabilité de symptômes et de pronostics.

2) Classification clinique de l'angor instable

a) **En 1989 Braunwald** a réalisé une classification (BRAUNWALD, 1989) tenant compte :

- De la sévérité : classes I, II et III
- Du terrain (circonstances cliniques) : Classes A, B et C
- De l'intensité du traitement (nitroglycérine) nécessaire : Classes 1, 2 et 3

Au niveau physiopathologique, cette classification est corrélée à l'importance des thrombus et à la complexité des lésions intracoronaires (haute cellularité, thrombus, néovaisseaux abondants, infiltrations de monocytes chez les patients appartenant aux classes les plus élevées telles que IIC, IIIB, IIIC) ainsi qu'à un risque accru de progression clinique vers un IDM.

Depuis l'introduction de cette classification, des progrès considérables ont été faits dans la compréhension de la physiopathologie et dans le traitement de cette maladie : cinq causes non exclusives mutuellement, sont reconnues actuellement.

- la présence d'un thrombus non-occlusif sur une plaque athéroscléromateuse préexistante.

- une obstruction dynamique
- une obstruction mécanique progressive
- une inflammation
- une angor instable secondaire

b) Pathogénèse des atteintes coronaires

La pathogénèse des atteintes coronaires est le résultat d'une évolution continue. Au début de ce processus, il y a une athérosclérose débutante chez un individu par ailleurs normal. A la fin, il y a occlusion totale d'un vaisseau coronaire, avec une nécrose trans pariétale de la paroi du myocarde.

A un stade intermédiaire, il y a une atteinte ischémique moins sévère, avec une grande majorité du myocarde encore intacte : Seules des aires microscopiques de cellules mortes (micro-infarctus) sont observées, dans un contexte clinique d'angor instable. Au cours de l'évolution, on peut également avoir une occlusion incomplète ou transitoire, avec une nécrose limitée à la région sous-endothéliale du myocarde.

Beaucoup de facteurs peuvent affecter l'importance de la mort cellulaire et les manifestations cliniques qui en résultent.

*** Stade 1 : Athérosclérose**

La pathogénèse des atteintes coronaires commence habituellement avec l'athérosclérose, une maladie qui touche les grosses et les moyennes artères. La lésion de base se développe sous la forme d'une plaque localisée dans l'intima de la paroi artérielle, avec un noyau de substances lipidiques et une enveloppe fibreuse. Lorsque les plaques augmentent de taille, elles saillent progressivement dans la lumière du vaisseau et compromettent ainsi l'écoulement sanguin. Ceci est le premier stade de

l'atteinte coronaire. Des années peuvent se passer avant que les lésions compromettent l'irrigation du myocarde et provoquent des manifestations cliniques, en général un angor.

* Stade 2 : Thrombogénèse intra-coronaire

Le second stade de l'atteinte coronaire est marqué par la rupture de la plaque d'athérosclérose. La rupture survient préférentiellement dans des plaques excentrées où l'enveloppe fibreuse est la plus mince et où une inflammation est présente. Des forces intrinsèques telles que l'impact de l'écoulement du sang sur la plaque, le rythme cardiaque ou la pression sanguine peuvent aussi prédisposer à la rupture de la plaque.

La rupture de la plaque met à nu son contenu thrombogénique, fait de collagène et de thromboplastine tissulaire. Ceci entraîne une cascade thrombotique avec une agrégation plaquettaire, formation de fibrine et développement d'un thrombus totalement ou partiellement occlusif.

* Conséquences cliniques

La conséquence clinique d'une rupture de plaque d'athérome et de l'installation d'un thrombus peut aller de l'angor stable aux syndromes coronaires aigus, incluant l'angor instable et l'infarctus. Les tableaux cliniques individuels dépendent de l'importance de l'obstruction, de la durée des perturbations de l'écoulement sanguin et des besoins en oxygène du myocarde.

Chez une petite minorité de patients, l'athérosclérose n'est pas en cause : des mécanismes tels que l'artérite, la dissection de l'artère coronaire, l'embolie coronaire et la prise de cocaïne ou d'amphétamines peuvent précipiter un syndrome coronaire aigu.

De la même façon, des conditions extrinsèques à la circulation coronaire précipitent un angor instable. Par exemple, la fièvre ou l'hypertension sévère peuvent accroître les besoins du myocarde en oxygène, alors que l'anémie ou l'hypotension peuvent réduire la fourniture en oxygène au niveau du myocarde.

c) **Des facteurs de risque** peuvent accroître la prédisposition individuelle à l'infarctus ou aux maladies coronariennes.

Ce sont ceux de l'athérosclérose coronarienne :

- tabagisme
- hypertension artérielle
- stress
- diabète
- hypercholestérolémie
- oestro-progestatifs
- sexe masculin

d) **2000 : modification de la classification par Hamm et Braunwald** C'est en raison de ces nouvelles connaissances qu'Hamm et Braunwald ont proposé d'ajouter une subdivision à la classe IIIB de Braunwald de 1989 (HAMM *et al*, 2000) :

- Classe IIIB TNeg (Troponine négative)
- Classe IIIB TPos (Troponine positive)

e) **Recommandations NACB**

L'Académie Nationale de Biochimie Clinique (NACB) a défini les directives actuelles pour l'utilisation des marqueurs cardiaques dans le diagnostic des maladies coronaires (WU *et al*, 1999).

- utiliser deux marqueurs : un précoce et un tardif (myoglobine et troponine)
- prélever les échantillons en série (à l'admission, après 2 à 4 heures, après 6 à 9 heures, et facultativement après 12 à 24 heures)
- établir 2 valeurs « seuil » pour un marqueur de grande sensibilité et spécificité comme la troponine cardiaque

B/ RAPPELS BIOLOGIQUES : les marqueurs biologiques usuels de la nécrose myocardique

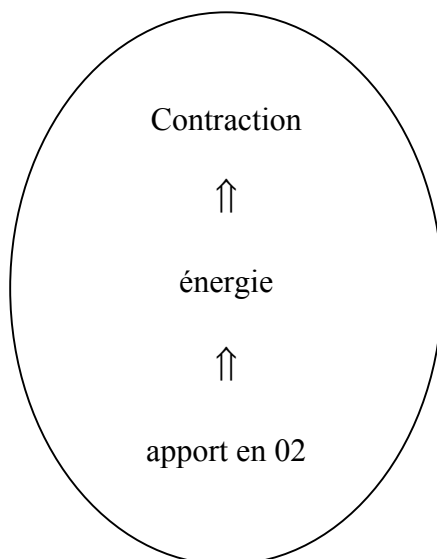
I - INTRODUCTION

1) Les marqueurs

Le myocyte, cellule constitutive du myocarde, comporte différentes protéines,

- ◆ Localisées préférentiellement dans le cytoplasme
 - Enzymatiques :
 - transaminases
 - créatine kinases
 - lactico-deshydrogénases
 - A fonction métabolique :
 - myoglobine
- ◆ Impliquées dans des fonctions structurales, donc non solubles :
 - troponines

Marqueurs spécifiques



⇒ Système actine-myosine
(associé au complexe troponine)

⇒ Créatine Kinase
(CK MM/CK MB)

⇒ Myoglobine

Cellule musculaire (muscle squelettique ou cardiaque)

2) Cinétique d'apparition dans la circulation sanguine

Lors de lésions ischémiques, les membranes altérées des myocytes libèrent dans le torrent circulatoire des éléments cytosolubles. Puis la lyse complète de la paroi entraîne le passage dans la circulation sanguine des protéines de l'appareil contractile. La présence de ces éléments dans le plasma signe l'ischémie myocardique.

Le poids moléculaire, la localisation cellulaire, ainsi que la solubilité de ces marqueurs biochimiques et leur demi-vie, expliquent l'hétérogénéité de leur cinétique plasmatique et par conséquent, des sensibilités diagnostiques variables en fonction du moment de réalisation du dosage. Ainsi, de petites protéines solubles comme la myoglobine diffusent rapidement et apparaissent précocement dans le sérum alors que les protéines plus grosses, comme la lactico-deshydrogénase, ou peu solubles, comme la Troponine, parviennent plus tardivement dans la circulation.

3) Cardiospécificité- Marqueur idéal

A côté de la vitesse d'apparition dans le sang périphérique, la spécificité cardiaque d'un marqueur est une caractéristique fondamentale. En effet, le marqueur idéal devrait :

- N'exister que dans le muscle cardiaque et pas dans les autres tissus quelle que soit la concentration ou la pathologie (cardiospécificité totale).
- S'y trouver en forte concentration pour une mesure sensible dans le sang.
- Etre relargué rapidement et en grande quantité.
- Etre proportionnel à l'étendue de la nécrose.
- Persister plusieurs heures pour une bonne fenêtre diagnostique.
- Avoir une concentration faible ou nulle chez le sujet sain.

Parmi les marqueurs cités, on peut distinguer :

- Ceux qui n'ont pas de spécificité d'organe et se trouvent dans le muscle strié : myoglobine, CK totales, ASAT.
- Ceux dont la concentration est différente dans le cœur et dans les muscles squelettiques : CKMB.

- Ceux dont la structure est différente dans le cœur et le muscle squelettique : troponines.

	P.M.	DETECTION	PIC	NORMALISATION	VALEURS NORMALES (ou SEUIL)
MYOGLOBINE	17800	2-4 h	8-12 h	24-36 h	0-90 ug/l
TROPONINE Ic	22500	3-6 h	12-24 h	5-10 j	1,5 ug/l / 0,1 ug/l
TROPONINE T	37500	3-12 h	12-24 h	5-14 j	0,10 ug/l
CK totale	87000	6-8 h	20-24 h	3-4 j	0-2,20 ukat
CK-MB	87000	4-6 h	12-20 h	2-3 j	0-6 ug/l
ASAT	110000	8-10 h	36-48 h	4-5 j	0-0,50 ukat

Tableau 1 : caractéristiques des principaux marqueurs cardiaques

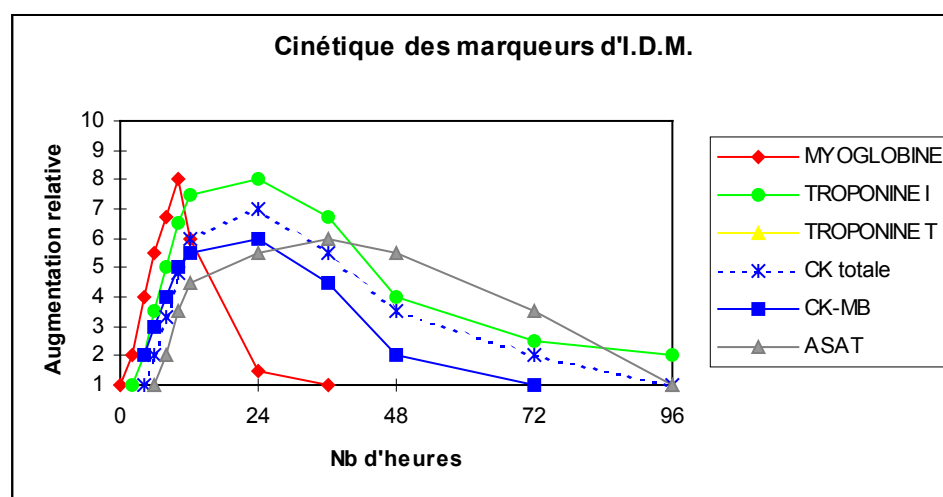


Figure 2 : cinétique d'apparition des principaux marqueurs cardiaques

II - Historique

Le premier marqueur utilisé dans l'infarctus du myocarde a été l'aspartate-amino-transférase (ASAT), décrite en 1954 par Karmen. Ce marqueur a ensuite été remplacé par la créatine kinase (CK), décrite en 1965 (Duma et Seigel).

Avec le développement des méthodes électrophorétiques, les isoenzymes de la CK et de la lactate deshydrogénase (LDH) ont été reconnues comme des marqueurs de plus haute spécificité (Roe en 1972). En 1978 un radioimmunodosage était développé pour la détection précoce de la myoglobine (Gilkeson et Al). L'intérêt de la TN Ic est

démontré pour la première fois en 1987 (Cummins et Al), tandis que celui de la TNTc apparaît en 1989 (Katus).

Enfin une nouvelle génération de marqueurs commence actuellement à se développer.

III - Marqueurs enzymatiques non spécifiques

1) ASAT :L-aspartate aminotransférase

a) Rôle physiologique et localisation

La L-aspartate-amino-transférase (ASAT), encore appelée glutamique-oxaloacétique-transférase (GOT) est une enzyme dont le rôle principal est de transférer des groupements aminés sur un acide α cétonique lors de la synthèse et de la dégradation des acides aminés .

Sa localisation cellulaire est cytoplasmique et mitochondriale.

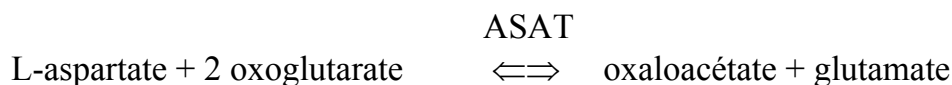
Sa masse moléculaire est de 90 à 93 kDa.

Elle est présente en forte concentration dans le foie, le muscle squelettique et le myocarde.

Sa demi-vie est de 48 heures.

b) Mesure de l'activité – valeurs usuelles

Les méthodes de mesure de l'activité catalytique de l'ASAT font appel au couplage de la réaction de transamination.



Avec une réaction indicatrice mettant en œuvre le système Nicotinamide Adénine Dinucléotide ($\text{NAD}^+ / \text{NADH} + \text{H}^+$)

Oxydation mesurée à 340 nm



(t° = 30 ou 37 °C suivant méthode)

Valeurs usuelles:	10 – 45 UI /L à 37°C	0-0,75 µkat/L
	10 – 30 UI /L à 30°C	0-0,50 µkat/L

c) Cinétique et intérêt clinique.

L'activité ASAT augmente entre la 8^{ème} et la 10^{ème} heure après le début de l'IDM, le pic se situant entre la 36^{ème} et la 48^{ème} heure, et le retour à la normale après 4 à 5 jours.

Bien qu'elle soit souvent mesurée au laboratoire de Biochimie, son manque de spécificité, son absence de précocité et sa signification limitée expliquent le déclin de son intérêt dans le diagnostic de l'IDM.

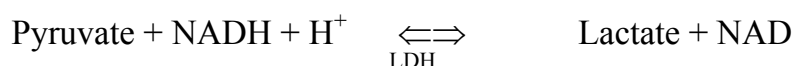
En effet, elle augmente dans de nombreuses autres circonstances cliniques : embolie pulmonaire, myocardite, cytolysse hépatique, atteinte musculaire squelettique.

Notons qu'en général on dose en même temps l'ALAT (Alanine aminotransférase) ou GPT (Glutamate Pyruvate Transaminase), ce qui permet un diagnostic différentiel notamment en cas de pathologie hépatique. Sa demi-vie est de 18 heures et elle est de localisation cytoplasmique uniquement. Les valeurs normales sont les mêmes que celles de l'ASAT.

2) LDH : Lactate déshydrogénase

a) Rôle physiologique et structure

La lacticodéshydrogénase, ou LDH, est une enzyme de masse moléculaire d'environ 135 kDa, qui catalyse l'oxydation du pyruvate en lactate (et inversement), en présence du coenzyme Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD)



Cette enzyme est un tétramère composé de l'association variable de sous-unités M (Muscle) et H (Heart).

Il existe 5 isoenzymes se distinguant par l'association des sous-unités et identifiables selon leur mobilité électrophorétique:

- LDH₁ (H₄) ou α HBDH (hydroxybutyrate-déshydrogénase).
- LDH₂ (H₃M)
- LDH₃ (H₂M₂)
- LDH₄ (H M₃)
- LDH₅ (M₄)

Ces isoenzymes sont présentes en grande quantité dans de nombreux tissus (cœur, reins, érythrocytes, rate, ganglions, poumons, foie, muscles...), mais il existe une répartition préférentielle selon la structure : On retrouve ainsi les sous-unités H dans les tissus et organes ayant un apport constant en oxygène et qui consomment du lactate (cœur, cerveau) ; les sous-unités M sont quant à elles plus abondantes dans les tissus susceptibles d'être exposés à une anaérobie transitoire et qui produisent de l'acide lactique (muscle).

La LDH₁ surtout (avec 35 à 70% de l'activité LDH) et dans une moindre proportion la LDH₂, prédominent au niveau cardiaque. C'est pourquoi on dosait auparavant l' α HBDH de façon spécifique.

b) Mesure de l'activité – valeurs usuelles

On mesure la diminution d'absorbance du NADH, H⁺ à 340 nm dans la réaction de formation du lactate à partir du pyruvate.

Il est également possible de séparer les isoenzymes et en particulier la LDH₁ par électrophorèse, séparation immunologique (immunoinhibition de la sous-unité M), séparation physique ou à l'aide de substrats spécifiques, mais ces techniques peu sensibles et peu spécifiques sont pratiquement abandonnées.

Valeurs usuelles: 190 à 370 UI /L à 37°C

3,17-6,17 μ kat/L

c) Cinétique et intérêt clinique

Après une ischémie myocardique, l'activité enzymatique de la LDH₁ augmente vers la 20^{ème} heure, le pic se situant vers le 3^{ème} jour. Puis les valeurs d'activité décroissent pour se normaliser vers le 10^{ème} jour (GUIDOLLET *et al*, 1991).

La LDH ne permet pas de diagnostic précoce d'IDM. Sa spécificité est médiocre et sa sensibilité insuffisante (augmentation dans les pathologies hépatiques, musculaires, rénales, néoplasiques et l'hémolyse intra-veineuse).

Elle peut permettre un diagnostic rétrospectif grâce à sa persistance dans le sérum. Il y aurait de plus une corrélation entre l'activité de la LDH et la taille de la lésion ischémique, ce qui en ferait un marqueur non-invasif de la masse nécrosée et permettrait la surveillance de l'évolution de l'infarctus.

3) La Créatine Kinase CK

a) Rôle physiologique et structure

Ils seront développés dans la partie concernant l'isoenzyme MB de la CK.

Son poids moléculaire est de 87 kDa

b) Mesure de l'activité des CK totales – Valeurs usuelles

Ce sont des mesures cinétiques.

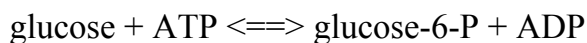
Leur principe repose sur une réaction primaire catalysée par le créatine kinase, suivie d'une réaction auxiliaire dont l'enzyme est une hexokinase.

Enfin, une dernière réaction met en jeu du NADP, catalysée par la G6PDH (glucose 6 phosphate déshydrogenase).

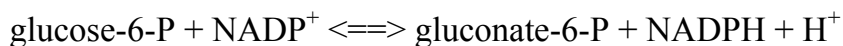
CK



HK



G6P-DH



Valeurs usuelles : 0 – 2,2 μ kat à 30°C
15 – 130 UI /L à 30°C
< 200 UI /L à 37°C

c) Cinétique et intérêt clinique

Les CK totales apparaissent dans le flux sanguin à partir de la 6^{ème} à la 8^{ème} heure après le début de l'infarctus. Le pic se situe de la 20^{ème} à la 24^{ème} heure et elles reviennent à la normale après 3 à 4 jours.

La mesure de l'activité des CK totales seule ne présente un intérêt que pour le diagnostic rétrospectif de l'IDM.

IV - La Myoglobine

a) Structure et rôle physiologique

La myoglobine est une hémoprotéine, vecteur intracellulaire de l'oxygène, de faible masse moléculaire (17.8 kDa), présente dans tous le types de myocytes.

Elle est localisée préférentiellement dans le cytoplasme et constitue environ 2% de son contenu total en protéines. Elle a donc une faible spécificité d'organe et son augmentation peut être retrouvée à la fois lors des pathologies d'origine cardiaque (infarctus, chirurgie cardiaque) et celles d'origine musculaire (exercice intense, dystrophie musculaire innée ou acquise, rhabdomyolyse). Son métabolisme est essentiellement rénal, puisqu'elle est normalement filtrée par le glomérule et réabsorbée par le tubule (demi-vie : 3 heures). Ainsi ne peut-on pas se baser sur son dosage pour le diagnostic de nécrose cardiaque chez les patients en insuffisance rénale et/ou présentant une atteinte musculaire (une hypermyoglobinémie est observée au cours des insuffisances rénales et la myoglobulinurie est positive à partir d'une concentration sérique supérieure à 200 μ g/L).

b) Dosage – Valeurs usuelles

La technique par immunoenzymofluorimétrie est illustrée dans le schéma suivant :

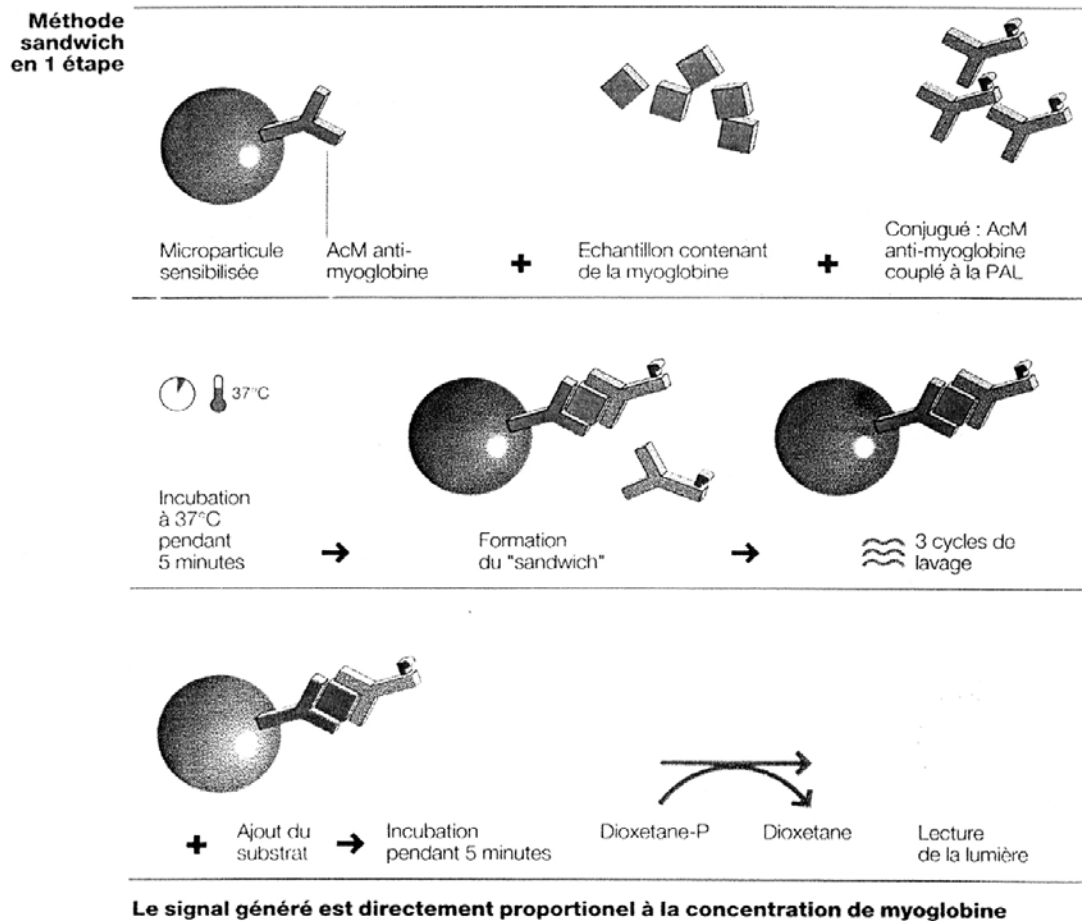


Figure 3 : schéma réactionnel du dosage de la myoglobine sur ACCESS® (d'après documentation Beckman Coulter)

Chez le sujet normal, la concentration en myoglobine varie de 0 à 90 µg/L. Elle est plus importante chez l'homme que chez la femme du fait de la masse musculaire plus importante.

Il existe de nombreuses techniques de dosage commercialisées, allant de l'agglutination au latex, à l'immunodosage de type sandwich et au radioimmunodosage.

Les techniques immunonéphélométriques ou immunoturbidimétriques utilisent comme réactif des particules de latex ou de polystyrène recouvertes d'Ac anti-myoglobine humaine. En présence de myoglobine, la formation des complexes Ag-Ac provoque un trouble du mélange réactionnel. On mesure la lumière diffusée par le complexe (Néphélométrie) ou la diminution de la lumière transmise (Turbidimétrie), dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de myoglobine présente dans l'échantillon.

c) Cinétique et intérêt diagnostic

La relation entre la myoglobinémie et l'infarctus du myocarde a été établie très tôt par Kagen (1975). Son augmentation au dessus du seuil pathologique (110 µg/l) est précoce, observée dès la deuxième heure.

Elle atteint son maximum en 8 à 12 heures et se normalise en 24 à 36 heures après le début des douleurs.

Son passage rapide dans le sang après la lyse des myocytes, qui constitue son principal intérêt clinique, est relié à sa faible masse moléculaire.

Il en fait le marqueur précoce de l'IDM.

Chez les patients présentant un IDM, la myoglobine possède une excellente sensibilité (80% entre la 3^{ème} et la 6^{ème} heure et 95% entre la 6^{ème} et la 12^{ème} heure). En revanche, une plus faible spécificité est observée (55 à 85%) par rapport à d'autres marqueurs tels que la CKMB.

C'est le marqueur "négatif" de l'infarctus du myocarde : son absence d'élévation entre 3 et 7 heures après le début de la douleur permet d'exclure l'IDM. Mais c'est surtout comme marqueur précoce non-invasif de la reperfusion que la myoglobine est employée, puisque sa cinétique est différente suivant que l'artère est désobstruée ou non.

Le dosage de la myoglobine urinaire peut présenter un intérêt dans le suivi des dommages rénaux induits par la rhabdomyolyse. A pH acide, la myoglobine précipite dans les tubules rénaux entraînant une obstruction et une diminution de la filtration glomérulaire. Son dosage permettrait de suivre l'apparition de l'insuffisance rénale aiguë post- rhabdomyolyse à partir d'une concentration urinaire supérieure à 18 mg/L.

V - CK-MB : Isoenzyme MB de la Créatine Kinase

1) Structure – Localisation

Comme nous l'avons dit précédemment, la CK est un enzyme soluble abondamment présent dans le cytoplasme des myocytes (cytosol et mitochondries). Elle catalyse, en présence de Mg^{++} , la réaction réversible de phosphorylation de la Créatine par l'ATP dans toutes les cellules musculaires.

La créatine kinase est un dimère constitué de l'association de deux monomères différents M (Muscle) et B (Brain), ce qui conduit à la formation de trois isoenzymes de localisations tissulaires différentes :

- CK-MM = CK3 => 99% des CK totales du muscle
 => 80% des CK totales du coeur
- CK-MB = CK2 => 1% des CK totales du muscle squelettique
 => 20% des CK totales du coeur
- CK-BB = CK1 => 100% dans le cerveau et quelques autres organes (utérus, prostate, rein, foie...)

L'isoenzyme MB est donc retrouvée principalement dans le myocarde (entre 5 et 50% de l'activité CK totale selon la zone étudiée), et dans le muscle squelettique (entre 0,4 et 5% de l'activité CK totale).

Dans le sérum d'un patient sain, la proportion relative des trois isoenzymes est d'environ 97% pour la forme MM, inférieure à 3% pour la forme MB et indétectable pour la forme BB, la barrière hématoencéphalique en limitant la diffusion.

Au cours de la phase précoce du développement fœtal, c'est le gène B qui s'exprime dans tous les tissus musculaires, et notamment squelettiques. Puis, plus tardivement dans le développement fœtal et post-natal, c'est le gène M qui le remplace. Chez l'adulte, l'expression du gène B peut être réactivée lors de maladies dégénératives du muscle squelettique, ou même lors d'exercice physique intense.

C'est la raison pour laquelle, en l'absence de toute lésion myocardique, on trouve dans ces circonstances une élévation des concentrations sériques de CKMB. On pourra limiter ces faux positifs en se basant sur l'Index Relatif IR :

$$IR = \frac{CKMB}{CK \text{ Totales}}$$

2) Méthodes de dosage

Deux types de méthodes sont utilisées pour doser la CKMB.

a) Les méthodes par immunoinhibition qui mesurent l'ACTIVITE de la CKMB (UI/L)

On mesure en fait l'activité des sous-unités B après inhibition spécifique des sous-unités M.

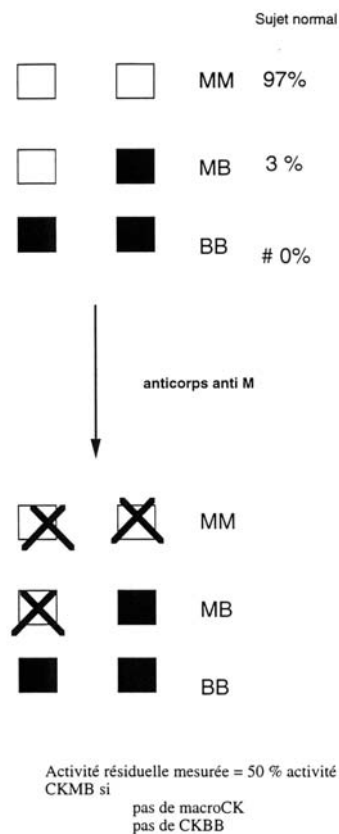


Figure 4 : principe du dosage de la CK-MB par immunoinhibition

Cette méthode est rapide mais donne des faux positifs dès l'instant que de la CK-BB est présente dans le sang (ARENAS *et al*, 1988).

b) **Les Méthodes par Immunoanalyse** qui mesurent la CONCENTRATION de CK-MB ($\mu\text{g/L}$)

Actuellement, c'est la méthode de choix pour le dosage de la CK-MB.

C'est un dosage immunologique de type ELISA "sandwich" : Deux anticorps monoclonaux distincts sont dirigés contre deux épitopes différents de la sous-unité MB. Le premier Ac, dit de capture, est spécifique du monomère B tandis que le second Ac marqué (Ac de révélation) est spécifique du monomère M.

L'intensité du signal émis par le marqueur est proportionnelle à la masse de CK-MB immobilisée. Les méthodes diffèrent par leur mode de révélation.

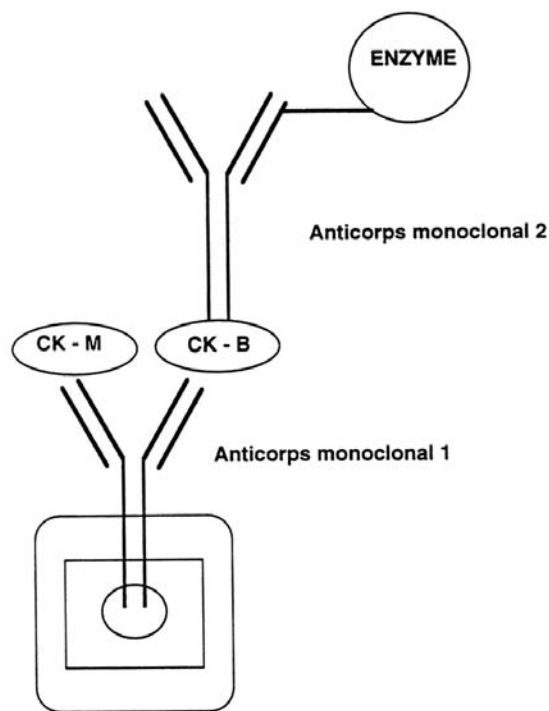


Figure 5 : principe du dosage de la CK-MB par enzymoimmunométrie (documentation Dade Behring)

Ces techniques présentent l'avantage d'être très spécifiques, puisque aucune interférence avec la CK-BB n'est décelée.

En revanche, leur prix de revient est élevé, elles sont soumises à “ l’effet crochet ” (saturation par un excès d’antigène) et il existe des interférences possibles avec des Ac hétérophiles ou des Ac Anti-souris.

3) Valeurs usuelles

Mesure de l’activité : 0-10 UI/L à 37°C 0-0,167 µkat/L

Dosage pondéral : 0-6 µg/L

Le seuil de positivité en faveur de l’IDM est situé au delà de ces valeurs.

Afin de limiter les faux-positifs, un index relatif (IR) peut être calculé

$$\text{IR} = \frac{\text{CKMB}}{\text{CK}_{\text{totales}}}$$

(µg/L) (UI/L)

Un IR supérieur à 1.5 est en faveur d’une nécrose myocardique.

4) Cinétique et intérêt clinique

La sensibilité est améliorée par le dosage pondéral. La spécificité de la CK-MB est moyenne en particulier en cas d’atteintes musculaires squelettiques, malgré l’utilisation de ratios plus discriminants comme l’IR. Il faut attendre la fenêtre diagnostique (10^{ème} – 16^{ème} heure) pour pouvoir affirmer ou exclure un IDM avec certitude. Ce délai est incompatible avec la mise en œuvre éventuelle d’une thérapeutique thrombolytique.

Les augmentations de la Créatine Kinase MB en dehors des pathologies cardiaques

Libération de la CKMB musculaire

Traumatisme
Chirurgie
Injections intramusculaires
Exercice extrême (marathonien)
Epilepsie
Myopathies inflammatoires ou non inflammatoires (myosites, rhabdomyolyse...)
Hyper ou hypothermie

Production de CKMB ectopique (tumeurs)

chez le sujet cancéreux, différentes formes de la CK peuvent être trouvées :
macro CK1 et macro CK2
CKMB excrétée par les tumeurs

Hypothyroïdie

Diminution de l'élimination de la CKMB
ou hyperproduction (?) origine musculaire: myalgies myœdèmes

VI - Le complexe des troponines

A / Structure et fonction

1) La contraction musculaire

Tous les types de muscles, lisses ou striés, engendrent le mouvement au moyen de la contraction. L'élément contractile de la cellule musculaire striée est la myofibrille, constituée d'unités régulièrement répétées : les sarcomères.

Chaque sarcomère contient lui-même deux séries de filaments protéiques :

- Le filament épais de myosine.
- Le filament fin constitué d'actine, de tropomyosine et du complexe ternaire des troponines.
- Le filament d'actine est constitué d'une double hélice d'actine F, l'actine F étant un polymère d'unités globulaires d'actine G.

- La tropomyosine, protéine fine composée de deux chaînes en hélice alpha, se loge dans le sillon de l'actine et favorise la rigidité du filament.

- Le complexe ternaire des troponines, retrouvé tous les sept monomères d'actine, est constitué de trois sous-unités polypeptidiques :

- La troponine I : TnI (PM= 21 kDa)
- La troponine T : TnT (PM= 37 kDa)
- La troponine C : TnC (PM= 18 kDa)

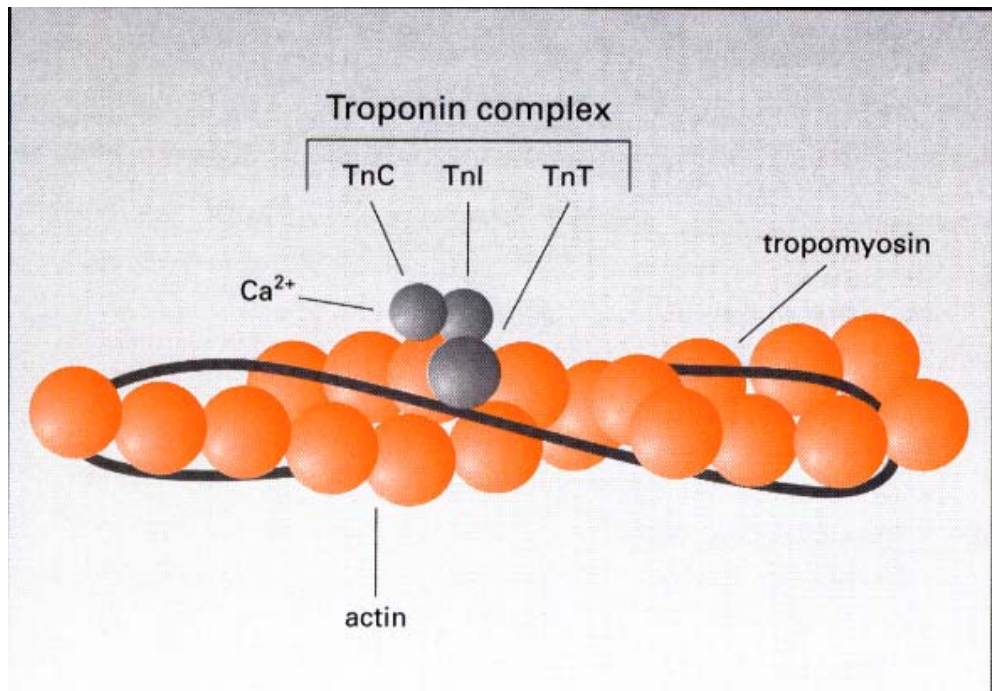


Figure 6 : schéma du complexe des troponines

La contraction musculaire est régulée par une cascade de signaux neuronaux d'où résulte une augmentation de la concentration du calcium cytosolique. L'interaction du calcium libéré, avec la troponine C (4 sites de fixation du calcium) va lever l'inhibition de l'interaction entre actine et myosine exercée par la troponine I et potentialisée par la tropomyosine. La troponine T sert ici de lien de transmission entre les troponines et la tropomyosine, permettant l'éloignement de cette dernière. Les têtes globulaires de la myosine vont pouvoir interagir avec l'actine, formant le complexe actomyosine. Elles exerceront alors pleinement leur activité ATPasique nécessaire pour fournir l'énergie de la contraction musculaire par l'hydrolyse de l'ATP. La contraction se fera par glissement des filaments fins et épais les uns sur les autres.

2) Les 3 sous-unités du complexe des troponines

Les protéines du complexe troponine, régulatrices de la contraction musculaire myocardique, sont codées par une super famille de gènes dont les membres sont exprimés différemment selon le type de fibre musculaire. Ce complexe au niveau cardiaque est exprimé préférentiellement dans l'atrium et le ventricule (LEFEVRE, 1998).

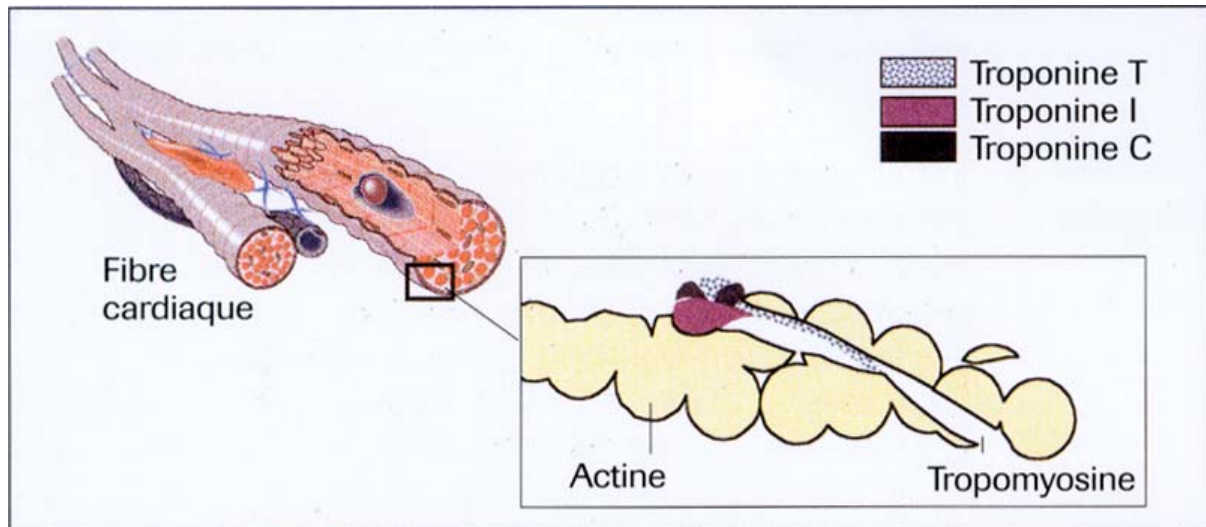


Figure 7 : structure de la fibre musculaire cardiaque

a) La troponine C (TNC)

La TNC, petite protéine acide de 18 kDa, représente la sous-unité du complexe capable de lier le calcium (C pour Calcium). Elle appartient au groupe des calciprotéines.

Il existerait une seule forme identique au niveau du cœur et du muscle squelettique (MAC COY, 1996) ou bien deux isoformes, exprimées différemment en fonction du type de tissu et au cours du développement.

La TNC squelettique (fTNC) serait exprimée dans le muscle squelettique rapide tandis que l'isoforme cardiaque (cTNC) serait une composante du muscle squelettique lent et cardiaque (VAN EERD *et al*, 1996).

La TNC présente une structure étendue en haltère avec deux domaines globulaires N et C-terminaux, séparés par une hélice centrale. Chaque domaine contient deux sites de liaison au calcium. Les sites calcium-spécifiques I et II du

domaine N sont de faible affinité pour le Ca^{++} . Ceux du domaine C, les sites III et IV sont de haute affinité pour le Ca^{++} et lient également le Mg^{++} .

Le rôle régulateur serait exercé par la liaison du Ca^{++} sur les sites I et II du domaine N, responsable de l'activation calcium-dépendante de la contraction musculaire. Le domaine C (sites III et IV) aurait plutôt un rôle structural d'ancrage de la TNC aux autres composants du complexe des troponines (SZSZESNA *et al*, 1996).

b) La troponine T (TNT)

Cette protéine peut être divisée en un domaine N-terminal (résidus 1-158) et un domaine C-terminal (résidus 159-259). La TNT (T pour Tropomyosine) sert à positionner le complexe des troponines sur la myofibrille.

Elle permet de propager l'effet inhibiteur de la TNI via la tropomyosine aux monomères d'actine en absence de calcium, de lever cette inhibition en présence de calcium, et d'activer l'ATPase de l'actomyosine. La région N-terminale de la TNT jouerait un rôle dans l'activation de l'ATPase tandis que la région C-terminale serait impliquée dans l'inhibition via la tropomyosine, la TNI et la TNC (MALNIC *et al*, 1998) (interaction indépendante du calcium entre la partie C-terminale de la TNT et la partie N-terminale de la TNI).

On dénombre douze isoformes musculaires squelettiques de la TNT, réparties dans les muscles lents et rapides, et deux isoformes cardiaques.

Ces isoformes sont identiques à 90% : leur hétérogénéité porte sur 6 à 11 aa (acides aminés).

c) La troponine I (TNI)

La TNI, sous-unité inhibitrice des troponines (I pour Inhibitrice) existe sous différentes isoformes :

- cardiaque : cTNI
- squelettique rapide : fTNI
- squelettique lent : sTNI

Leur poids moléculaire varie de 19.8 kDa à 22.5 kDa. Une analyse des séquences des isoformes de TNI et de leur cDNA inter et intra espèces indique que la

moitié C-terminale de la protéine (résidus 101 à 182) est hautement conservée alors que la moitié N-Terminale présente de grandes divergences de taille comme de séquence (WU *et al*, 1993).

La TNI est une protéine basique constituée d'une seule chaîne polypeptidique : l'isoforme cardiaque se présente comme une protéine de type tout α (FERRIERES *et al*, 1998).

Elle est de type globulaire compact avec un cœur hydrophobe (LESZYK *et al*, 1998).

Mais la TNI isolée pourrait se présenter sous une forme étendue et flexible, expliquant sa grande sensibilité à la protéolyse et la phosphorylation possible de plusieurs résidus.

Cette caractéristique permettrait à sa chaîne polypeptidique de s'adapter pour interagir avec les différentes protéines du filament fin ; actine, tropomyosine, TNC et TNT, jouant un rôle central dans le processus de régularisation de la contraction musculaire (PERRY, 1999).

En liant l'actine et en empêchant la formation du complexe actomyosine, la TNI inhibe l'activité Mg^{++} ATPasique de ce complexe. Cette activité inhibitrice est potentialisée par la présence de tropomyosine et peut être neutralisée par la formation d'un complexe avec la TNC en présence de Ca^{++} .

Ainsi, la TNI “ se balance entre l'actine en l'absence de Ca^{++} et la TNC en présence de Ca^{++} .”

La région de la TNI, située sur la partie N-terminale, responsable de cet effet inhibiteur est appelée le peptide inhibiteur . Certains résidus C-terminaux seraient aussi en cause dans cette interaction.

Une meilleure compréhension de l'interaction entre la TNI et la TNC ainsi que la détermination de leur conformation dans le complexe binaire I/C ou ternaire I/T/C est d'un grand intérêt pour mieux percevoir à terme les processus moléculaires aboutissant à la contraction et à sa régulation.

L'isoforme cardiaque humaine de la TNI possède une séquence de 31 acides aminés supplémentaires sur son extrémité N-terminale par rapport aux isoformes des

muscles squelettiques, ce qui induit une différence de 40% (ou au contraire une homologie de 60%).

Cette séquence polypeptidique possède une propriété unique, celle de pouvoir être phosphorylée *in vivo* sur une sérine par une protéine kinase activée par l'AMPcyclique. Le rôle physiologique de cette phosphorylation sur la TNI serait de permettre au myocarde de répondre aux fluctuations hormonales.

Par exemple, après une stimulation par l'adrénaline, la sensibilité au Ca^{++} du système activateur (TNC) est réduite. Ce mécanisme permettrait d'éviter la surstimulation cardiaque induite par les catécholamines grâce à un phénomène de rétrocontrôle négatif.

La troponine I cardiaque n'est pas exprimée dans le muscle squelettique durant le développement fœtal ou dans le muscle squelettique de l'adulte en réponse à un stimulus pathologique. Elle peut ainsi être plus spécifique que la TNT cardiaque chez les malades atteints de maladies musculaires chroniques (BROWN *et al*, 1997).

La TNTc fœtale, qui est semblable à la sTNI, est l'isoforme cardiaque prédominante pendant la période fœtale. La complète transition en TNic ne se fait chez l'homme qu'après la naissance. C'est pourquoi la TNic reste confinée au myocarde et n'est jamais réexprimée dans le muscle squelettique (BODOR, 1994).

B / Intérêt du dosage des troponines I et T

Le dosage de la TNC ne présente pas d'intérêt car non cardio-spécifique.

1) Introduction : 2 seuils décisionnels

Du fait de leur spécificité myocardique c'est bien évidemment dans les situations de souffrance myocardique, au premier rang desquelles les souffrances d'origine ischémique, que le dosage des troponines I et T va être particulièrement utile.

Les syndromes coronariens pouvant être considérés comme un continuum pathologique, une élévation même modérée de la troponine définit un patient à risque. L'importance de ce risque est proportionnelle à l'élévation de la concentration de troponine I et T. Il existe pour la troponine deux seuils diagnostiques :

- Le premier est défini comme la valeur correspondant au 99^{ème} percentile d'une population indemne de pathologie cardiaque et définit la valeur seuil de référence.
- Le deuxième, seuil décisionnel de l'IDM, doit être calculé par la construction de la courbe ROC (Receiver Operating Characteristic curve) en comparant une population présentant un IDM à une population de patients indemnes .

Tout patient présentant une valeur intermédiaire entre les 2 seuils doit être suivi et considéré comme présentant des “ dommages myocardiques ”(LEFEVRE, 2000).

2) Diagnostic de l'IDM

Dans les cas classiques d'IDM, le diagnostic peut être affirmé par l'association des signes électrocardiographiques et de la douleur. Le dosage des marqueurs n'est alors pas nécessaire sauf a posteriori, pour orienter le patient vers les structures adéquates.

a) Diagnostic précoce de l'IDM

Dans le cas d'une prise en charge précoce la troponine n'aura pas eu le temps de s'élever. Dans ces circonstances, le dosage de la myoglobine paraît mieux adapté car elle s'élève plus précocement (vers la 3^{ème} heure des symptômes).

Si le patient se présente plus tardivement, après la 6^{ème} heure, les troponines I et T sont dosables qualitativement (bandelettes). Ces tests qualitatifs ont notamment un intérêt diagnostique et pronostique puisque les patients dont les résultats de 2 tests réalisés à 4 heures d'intervalle sont négatifs, ont un taux de complications quasi-nul.

Toutefois ces résultats ne permettent en rien d'exclure un problème coronarien aigu et imposent le recours au sens clinique pour décider de l'hospitalisation ou non du patient.

b) Diagnostic de certitude d'IDM

Bien différente est la situation où, dans un contexte de douleurs précordiales suspectes, l'ECG est peu contributif ou non-caricatural ou ininterprétable (bloc de branche, stimulateur cardiaque).

C'est alors, devant la nécessité d'une certitude diagnostique, que le dosage de la troponine prend toute sa valeur. C'est le cas pour les patients opérés en chirurgie vasculaire ou en neurochirurgie, pour la détection d'infarctus périopératoires : la troponine est le marqueur le plus spécifique.

De même après un choc électrique externe, il y a absence d'élévation de la troponine alors que d'autres marqueurs s'élèvent du fait de la contusion.

c) Diagnostic rétrospectif d'IDM

Une situation particulière est représentée par le diagnostic rétrospectif d'IDM. Dans ce cas de figure, où le médecin est amené à voir en consultation un patient quelques jours après un épisode infarctoïde dont l'ECG révèle des traces de nécrose récente, la troponine du fait de sa longue demi-vie, se révèle plus performante que la LDH employée jusqu'alors (MARTINS *et al*, 1996).

3) Diagnostic de la reperfusion après thrombolyse

La revascularisation est l'objectif thérapeutique essentiel en cas d'IDM. Elle doit être réalisée le plus rapidement possible, au mieux en moins de 6 heures, au pire entre 6 et 12 heures après le début des douleurs.

Cet objectif peut être atteint par un traitement chimique (thrombolytique) ou physique (angioplastie). En permettant la recirculation coronaire, il limite l'importance de la nécrose et diminue la mortalité de l'IDM. Celle-ci est appréciée par la coronarographie et jugée par le score TIMI (Thrombolysis in myocardial infarction) : un grade 3 correspond à une reperfusion, un grade 0 à 2 indique une occlusion plus ou moins complète.

La détection non-invasive des échecs de la thrombolyse est un point important de la prise en charge des patients à la phase aiguë d'un IDM, motivée par 2 raisons, thérapeutique (proposer au patient une angioplastie de sauvetage en urgence) et pronostique (plus mauvais pronostic des patients dont l'artère responsable de l'infarctus reste occluse après thrombolyse). Si la méthode de référence est actuellement comme nous l'indiquons ci-dessus la coronarographie faite au décours immédiat de la thrombolyse, à la 90^{ème} minute, sa réalisation impose des contraintes

lourdes en matériel et en personnel, obligeant à une disponibilité constante 24 heures sur 24.

La variation des concentrations des marqueurs biochimiques apporte une solution simple et performante à ce problème. Si la reperfusion est efficace, le sang irrigue la zone de nécrose et une quantité importante de protéine myocytaire passe dans la circulation (phénomène de rinçage). La reperfusion survient dans un intervalle de 90 à 120 minutes après le début du traitement ; c'est pourquoi l'IFCC préconise de mesurer dans 2 prélèvements réalisés au début et à 90 minutes après le début du traitement les valeurs des marqueurs cardiaques.

Les indices les plus performants pour ces marqueurs biochimiques sont donc établis non pas à partir des pics sériques, mais à partir de la pente d'élévation des taux sériques, ou de l'augmentation relative de ces taux sériques sur 90 minutes, plus élevés chez les patients thrombolysés avec succès.

$$R = (T90 - T0) / T0$$

Pour Apple *et al*, l'augmentation relative de la TNiC est supérieure à celle de la CK-MBm et de la myoglobine chez les patients au stade TIMI 3 (rapport de 30 pour la CK-MB massique et 300 pour la TNiC en cas de revascularisation (APPLE *et al*, 1997).

4) Appréciation de la taille de l'infarctus

La mortalité est directement corrélée à la taille de l'IDM

Les méthodes de mesure de la masse nécrosée par les méthodes traditionnelles, lourdes de réalisation, sont supplantées par l'évaluation indirecte au moyen des méthodes d'imagerie (échographie, techniques isotopiques ou angiographiques). L'intérêt pratique des méthodes biochimiques est donc marginal.

Les caractéristiques de la cinétique de la troponine ne sont pas encore clairement déterminées, rendant alors impossible une quantification correcte. Néanmoins, un taux élevé de troponine T à la phase aiguë d'un IDM est corrélé à une mortalité accrue.

5) Diagnostic de lésions myocardiques minimales : Angor instable

Durant les épisodes d'angor instable, des élévations significatives de troponine T ou I ont pu être observées, alors que les marqueurs traditionnels restaient dans les limites de la normale. Cette situation traduit à l'évidence la nécrose de quantités minimales de tissu myocardique. Les patients présentant une telle élévation avaient un pronostic à court terme et à plus long terme plus sombre que les patients dont la troponine ne s'élevait pas.

Ces patients, qui dans l'ancienne classification diagnostique de l'OMS des syndromes coronariens aigus faisaient partie des angors instables avec nécrose myocardique, sont dorénavant classés en infarctus sans élévation du segment ST (bien que les CK-MB soient normales) par le document commun ESC/ACC.

Seuls sont classés en angor instable les patients dont la troponine est négative.

6) Atteintes musculaires

Dès 1994, Adams *et al* montraient que les concentrations sanguines de TNIf, contrairement à celles de CK-MB, n'augmentent pas chez les sujets soumis à une agression musculaire (ADAMS *et al*, 1994), ce qui confirme sa plus grande cardiospécificité.

7) Insuffisance rénale

Il existe souvent à moyen et long terme, chez les sujets présentant une insuffisance rénale chronique, des complications cardio-vasculaires importantes. Chez ces patients il est généralement difficile de réaliser des épreuves dynamiques d'exploration cardiaque.

Au repos existent souvent des anomalies de l'ECG, sans douleur : Une ischémie myocardique atypique est souvent retrouvée. Des augmentations de la CK et de la CK-MB en l'absence d'ischémie sont fréquentes. Chez ces patients (créatinine >460 µmol/L), la survenue des complications cardiaques graves est corrélée à l'augmentation de la TNIf (VORS *et al*, 1996).

8) Autres pathologies

Grâce à la sensibilité analytique importante des troponines, leur dosage a été préconisé dans le suivi ou le diagnostic de différentes pathologies où une nécrose limitée peut être mise en évidence.

- Le dosage de la TnIc a ainsi été préconisé dans le suivi de la cardio-toxicité chimio-induite par les anti-cancéreux comme les anthracyclines ou la doxorubicine ainsi que dans les diagnostics de contusions cardiaques, où ces tests seraient plus spécifiques que la CK-Mbmasse (MISSOV *et al*, 1997).
- Le choc septique est défini par une défaillance aiguë de la micro-circulation, responsable d'une hypoperfusion tissulaire. L'anoxie tissulaire et de la chute du débit cardiaque semblent suffisantes à augmenter la valeur de la TnIc chez les patients en état de choc : dans ce cas, la TnIc ne différencie pas nécrose et ischémie et pose le problème de sa valeur pronostique en terme de complication myocardique irréversible ou de souffrance myocardique réversible. L'association du dosage du lactate (marqueur essentiel de l'anoxie tissulaire) permettrait la surveillance de l'atteinte myocardique dans ce contexte. Par ailleurs, lors d'un état de choc septique, l'atteinte myocardique résulte de l'action directe de médiateurs (cytokines...) sur le myocarde et la micro-circulation entraînant une altération de la fonction ventriculaire gauche (dont l'origine ischémique est exclue) libérant la TnIc.
- Les troponines pourraient également être utilisées comme outil de sélection des greffons prélevés en vue de transplantation cardiaque (RIOU *et al*, 1995). L'augmentation de la TnIc sanguine chez le donneur ne serait pas un facteur prédictif du rejet de la greffe cardiaque, mais renseignerait sur la qualité du greffon.
- L'hypothyroïdie est fréquemment associée à une augmentation de l'activité CK totale et de la CK-MB. La TnIc reste toujours inférieure à la normale et permettrait de détecter les pathologies coronaires qui peuvent survenir à cause de l'hypertension et de l'hypercholestérolémie associées (COHEN *et al*, 1997).

- La TNic est également retrouvée augmentée en cas d'intoxication au monoxyde de carbone, syndrome où les complications cardiaques sont fréquentes : elle est corrélée à l'augmentation de la carboxyhémoglobine (FELD *et al*, 1997).

VII Les nouveaux marqueurs(WU et MAC CORD, 1998)

1) Protéines de l'inflammation

L'augmentation de la CRP (Protéine C réactive) et de la protéine A sérum amyloïde (marqueur de l'inflammation), est connue pour n'être pas spécifique, mais pour jouer un rôle dans l'identification du risque des patients présentant un syndrome coronarien : L'augmentation sérique de la concentration de ces deux protéines signe une instabilité de la plaque d'athérome (CRP chez patient à angor stable < patients à angor instable < patients à IDM). L'intérêt majeur de la CRP se situe dans la stratification du risque couru à long terme (IDM et arrêt cardiaque dans les deux ans), indépendamment de l'âge, du sexe, des facteurs de risques des traitements médicamenteux ou de l'étendue de l'athérosclérose coronarienne .

2) L'activation des plaquettes

C'est comme nous l'avons vu précédemment un mécanisme important dans la formation du thrombus. Des indicateurs de cette activation tels que l'essai fonctionnel des plaquettes, l'étude des fonctions plaquettaires ou l'augmentation de la P-selectine peuvent permettre de savoir si le patient a une susceptibilité à la thrombose coronarienne. La P-selectine est une molécule d'adhésion exprimée à la surface des plaquettes activées. Son expression augmente chez les patients montrant des symptômes de maladies coronariennes aiguës. La P-selectine est un marqueur de "l'agressivité" plaquettaire, elle indique leur tendance à adhérer aux leucocytes, causant leur accumulation, et par conséquence, les complications thrombotiques.

3) Les marqueurs de thrombose

Ils incluent la fibrine et ses produits de dégradation et peuvent aussi révéler un processus thrombotique récent. Ces marqueurs sont le reflet d'une activité fibrinolytique pro-coagulante. Ses produits de dégradation ne sont pas assez sensibles

pour permettre le diagnostic d'infarctus du myocarde, mais sont augmentés chez les patients à haut risque de complications.

4) L'isoenzyme BB de la glycogène phosphorylase (GPBB)

C'est une enzyme prometteuse pour la détection précoce en laboratoire de l'ischémie cardiaque (MAIR, 1997).

Cet enzyme glycolytique joue un rôle essentiel dans le métabolisme hydrocarboné par la mobilisation du glycogène.

Il existe trois isoformes de GP :

- GPLL (liver)
- GPMM (muscle)
- GPBB (brain)

Dans le cœur humain, deux formes, GPBB de façon prédominante, et GPMM sont retrouvées. La spécificité cardiaque de GPBB n'est donc pas absolue ni du même ordre que celle de la CK-MB. Son intérêt porte sur sa précocité, elle augmente dans les une à quatre heures après le début de la douleur et retourne à la normale en un ou deux jours. Une libération précoce de GPBB a été observée pour des patients atteints d'angor véritable.

5) Le BNP (Brain Natriuretic Peptide)

C'est une hormone de 32 acides aminés impliquée dans la régulation de la volémie, de la balance sodique et de la pression sanguine. Il est sécrété par les cardiomyocytes, et provient donc essentiellement du ventricule gauche mais également du ventricule droit. De forts taux sanguins de BNP ont été corrélés à une réduction de la fraction d'éjection du cœur (UNGERER *et al*, 1993).

Dans l'IDM, les taux de BNP sont augmentés avec une cinétique de libération d'allure biphasique.

6) La H-FABPc (Heart type cytoplasmic fatty acid binding protein)

C'est une petite protéine cytoplasmique (PM 14-15 kDa), transporteur des acides gras à longues chaînes. Son augmentation est précoce et plus spécifique que la

myoglobine (le muscle squelettique n'en contient que 10 à 30% par rapport au muscle cardiaque).(ISHII , 1997)

7) La TpP (Thrombus precursor Protein)

C'est un marqueur d'état thrombotique dont l'élévation précède l'infarctus et revient à la normale une fois celui-ci constitué.(CARVILLE , 1996)

8) Chaînes légères et chaînes lourdes de la myosine

La molécule de myosine, trouvée dans le muscle cardiaque et squelettique est constituée de deux chaînes lourdes (MHC) et de deux paires de chaînes légères (MLC), l'une de type I, l'autre de type II (ONRAED *et al*, 1995).

Cette protéine myofibrillaire va interagir durant la contraction musculaire avec l'actine afin de générer la force contractile du muscle.

La méthode de dosage radio-immunologique de type sandwich peut utiliser soit des anticorps anti-chaînes légères, soit des anticorps anti-chaînes lourdes β de la myosine marqués à l'I¹²⁵. Mais ce dosage est long.

Les chaînes légères (PM 20 ou 27 kDa) apparaissent dans le sérum 6 à 12 heures après le début de la douleur, le pic ayant lieu après 2 à 4 jours. Les concentrations sériques redeviennent normales en 6 à 12 jours.

Les chaînes lourdes (PM 400 kDa) apparaissent plus tardivement, au delà de la 24^{ème} heure, tandis que le pic s'élève en 5 à 6 jours et que la concentration se normalise en environ 14 jours.

L'importante inertie de la cinétique de libération de ce marqueur s'explique par sa répartition au niveau des myocytes : 99% des chaînes légères sont liées à l'appareil contractile, tandis que seule une faible quantité sera présente dans le pool cytosolique, qui sera libérée très tôt après le processus de lésion membranaire des myocytes mais influence très peu le dosage. La libération de myosine dans la circulation sera donc la conséquence de la perte de l'intégrité membranaire, provoquant des changements de pH ainsi que la libération d'enzymes protéolytiques. La myosine liée sera dissociée et retrouvée en quantités significatives dans le sérum. Ainsi, seule une première ischémie

permet le relargage tardif du marqueur, qui par ailleurs sera peu influencé par les variations de perfusion myocardique ou de récurrence ischémique.

Valeurs de référence : 30 à 130 $\mu\text{UI/L}$

Seuil décisionnel de suspicion d'IDM : 300 $\mu\text{UI/L}$

La cinétique lente de la myosine justifie son utilisation pour le diagnostic rétrospectif de l'infarctus du myocarde. Ce marqueur est de plus utilisé pour la détermination de l'étendue du territoire nécrosé. Ceci est intéressant à connaître puisqu'une nécrose importante influe sur le ventricule gauche (STORDEUR *et al*, 1994).

L'étude d'une cinétique complexe de relargage de la myosine et l'analyse des pics permettent la sélection de groupes à risque.

Enfin, après traitement thrombolytique, la concentration en myosine est significativement inférieure chez les patients chez qui le traitement fibrinolytique est un succès par rapport à ceux pour lesquels la fibrinolyse est un échec (LARUE *et al*, 1989).

9) L'IMA : Ischemia Modified Albumin

a) Historique

L'IMA a été identifiée au début des années 1990 par un médecin urgentiste qui cherchait un marqueur précoce et fiable de l'ischémie. Il remarqua des différences entre l'albumine des patients sains volontaires et celle des patients souffrant d'ischémie. Plus tard, on s'aperçut qu'il s'agissait d'altérations du côté N-terminal de l'albumine sérique (BAROR *et al*, 1999).

b) Structure (Ischemia Technologies, 2003)

L'IMA est rencontrée lorsque l'albumine circulante entre en contact avec un tissu en ischémie, que ce soit le cœur ou un autre organe. Elle y subit deux types de modifications :

- Il y a libération d'ions cuivre qui sont captés et liés sur sa partie N-terminale, donnant naissance à l'IMA *variant* « cuivre sur la partie N-terminale ».
- Il y a production de radicaux libres qui endommagent cette même partie N-terminale, la rendant incapable de lier les métaux, aboutissant à l'IMA *variant* « partie N-terminale tronquée de 2 à 4 aa »

c) Mécanisme d'action

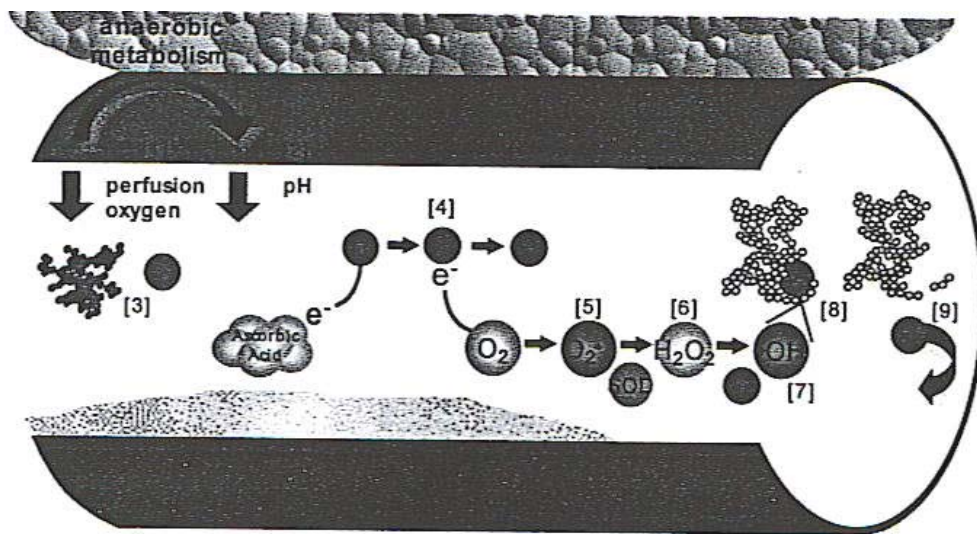


Figure 8 : mécanisme de la modification de l'albumine par l'ischémie

Après rupture d'une plaque d'athérome et formation d'un caillot, la réduction du flux sanguin entraîne un manque d'oxygène dans le tissu [1]. Ce manque d' O_2 oblige les cellules à utiliser le métabolisme anaérobie, d'où une baisse du pH [2]. Dans ce micro-environnement d'ischémie, la chute du pH provoque un relargage du cuivre (Cu^{2+}) lié aux protéines circulantes [3].

En présence d'un agent réducteur tel que l'acide ascorbique, l'ion Cu^{2+} est réduit en Cu^+ [4]. L'ion Cu^+ réagit avec l' O_2 et forme des radicaux libres superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) [5]. La superoxyde dismutase (SOD) transforme les radicaux superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [6].

En situation normale, l' H_2O_2 est dégradé en eau et oxygène par une catalase. Cependant, en présence de métaux tels que le fer ou le cuivre, l' H_2O_2 subit une réaction de Fenton, formant alors des radicaux libres hydroxyl ($\text{OH}^\cdot$) [7].

Les ions Cu^{2+} libres sont captés par l'albumine, où ils se lient à la partie N-terminale. Les radicaux hydroxyl étant très réactifs, ils peuvent endommager de nombreuses protéines, dont l'albumine, en clivant notamment 2 à 4 aa sur le site de liaison N-terminal [8]. Ce clivage rend l'albumine incapable de se lier fortement aux métaux de transition : le cuivre lié est alors libéré [9] et pourra être capté par une autre albumine native. Cela provoque une réaction en chaîne qui explique l'augmentation importante d'IMA sérique observée.

d) Principe du dosage : ACB test (Albumin Cobalt Binding test) (WU, 2003)

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'AMI présente une capacité réduite à lier certains métaux de transition due la modification de son site N-terminal par exposition aux radicaux libres.

Le principe de l'ACB test consiste à mettre en parallèle un sérum de sujet normal (contenant une certaine quantité d'albumine native), et le sérum d'un patient souffrant d'ischémie (dont une partie de l'albumine se trouve modifiée (IMA)). Après addition d'une solution de cobalt (Co^{2+}), ce dernier ne se liera qu'à l'albumine native et sa concentration finale sera inversement proportionnelle à celle d'AMI présente.

Le dosage des ions Co^{2+} résiduels est révélé par addition de dithiothreitol (réaction colorée dont on mesure l'intensité par spectrophotométrie à 500 nm).

La limite supérieure de normalité de l'ACB test est fixée à 80 UI/mL (25-80UI/mL). Sa limite de sensibilité est à 14 UI/mL.

e) Intérêt clinique (WU, 2003)

Au cours d'un événement ischémique, la production d'IMA est immédiate (quelques minutes) et en quantité importante (en 2 à 3 heures, retour au taux de base en 6 heures), permettant une détection facile. Les marqueurs classiques de la nécrose myocardique ne sont pas relargués durant les premières heures suivant le début de la douleur. De plus, jusqu'à récemment, il n'existait pas de marqueur permettant de

détecter la présence d'une ischémie réversible. Or, un test spécifique de l'ischémie cardiaque serait primordial pour un diagnostic précoce et un tri des patients qui entrent aux Urgences pour douleurs précordiales (impact économique et rapidité de traitement approprié).

La spécificité clinique de l'IMA (46%) est moins bonne que celle des troponines (99%) ou de l'ECG (91%). Utilisée seule, sa sensibilité est de 86%, mais associée à un dosage de troponine et/ou à un ECG, sa valeur prédictive négative monte à 97 et 100%.

Notons que l'on peut observer des augmentations de l'IMA chez des patients souffrant d'insuffisance rénale terminale ou de certains cancers, mais pas en cas de traumatisme, de maladie auto-immune, d'hypoxie ou d'ischémie du muscle squelettique.

10) la PAPP-A (Pregnancy-associated plasma protein A) (BAYER-GENIS, 2001)

La PAPP-A fait partie de la superfamille des métalloprotéines (liant le zinc), initialement isolée chez la femme enceinte, chez laquelle elle augmente jusqu'au terme, et que l'on utilise pour le diagnostic fœtal du syndrome de Down.

Elle est en outre un activateur spécifique de l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1), médiateur de l'athérosclérose, par son activité de clivage de l'IGF-1 binding protein, ce qui lui confère une propriété potentiellement proathérosclérosante.

Elle serait produite par les cellules activées dans les plaques instables d'athérome, et relarguée dans la matrice extracellulaire qu'elle dégrade, provoquant la rupture de la plaque.

La PAPP-A serait donc un marqueur sensible et spécifique de l'instabilité des plaques d'athérosclérose, indépendant de l'âge, du sexe, des facteurs de risques cardiovasculaires ou des traitements médicamenteux du patient.

La valeur normale est < 10 mUI/L (patient volontaire ou angor stable).

La sensibilité du dosage pour les syndromes coronariens aigus est de 89,2% (angor instable : 85%, IDM : 94,1%), la spécificité de 81,3%.

2^{ème} partie :

**METHODES DE DOSAGE DES
TROPONINES I et T**

2^{ème} partie : METHODES DE DOSAGE DES TROPONINES I et T

I – Généralités : diverses méthodes sur le marché

La plupart des tests commerciaux proposant le dosage de la troponine Ic ont pour point commun d'être des techniques E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) type "sandwich" :

- un premier anticorps anti-troponine Ic est fixé sur une phase solide .
- le sérum à doser est mis en contact avec cet Ac.
- un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine Ic nommé conjugué sur lequel est fixé un système de révélation est ajouté.
- puis il y a élution de la partie du conjugué non fixée à la troponine (en excès).
- enfin révélation grâce à l'addition d'un substrat spécifique qui émettra un signal proportionnel à la quantité d'anticorps donc de troponine retenue en sandwich c'est à dire présente au départ dans le sérum.

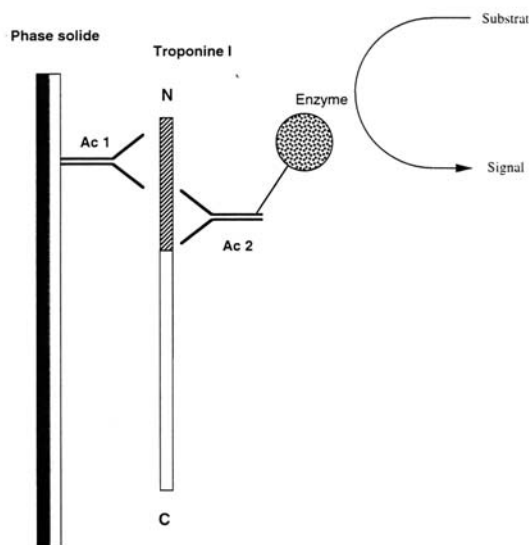


Figure 9 : principe général du dosage de la troponine

Les tests commercialisés diffèrent en revanche par :

- la nature des anticorps utilisés
- la localisation des épitopes de la troponine Ic reconnus
- la méthode de révélation

II - Méthode de dosage et cinétique de la TNT

1) Méthode de dosage

En 1994, la “ Food and Drug Administration ” approuve le dosage quantitatif de la TnTc pour son utilisation clinique aux USA (ANTMAN *et al*, 1995).

La société Roche est la seule à proposer actuellement un dosage en routine de la TnTc.

La méthode ELISA est une méthode immuno-enzymométrique (IEMA), dite “sandwich” puisque la TNTc à doser sera reconnue et liée par deux anticorps dirigés contre des épitopes différents : l’un biotinylé est fixé aux tubes recouverts de streptavidine et constitue la phase solide (Ac de capture), tandis que l’autre est rajouté en solution et est marqué par la peroxydase (Ac de révélation). Une étape de lavage est nécessaire pour éliminer les Ac libres en excès. La révélation est ensuite réalisée par l’addition d’un substrat chromogène (sel de diammonium de l’acide azimo 2, 2’-di[éthyl-3 benzothiazoline sulfonique-6] ou ABTS) ainsi que celle d’un substrat de la peroxydase (le peroxyde d’hydrogène ou H₂O₂).

La première génération de tests pêchait par manque de spécificité pour l’isoforme cardiaque, ce qui entraînait des interférences avec les troponines T musculaires dans des conditions telles que la rhabdomyolyse ou l’insuffisance rénale chronique. Depuis, plusieurs générations de tests se sont succédées, améliorant cette spécificité et la rapidité d’exécution du dosage sur automate (ELECSYS System® ou ES System®).

La méthode ELECSYS® est une méthode d’immunoanalyse par électrochimiluminescence (ECLIA) : un premier anticorps monoclonal anti-cTNT est biotinylé, un deuxième anticorps monoclonal anti-cTNT est marqué par du ruthénium. Après addition de microparticules magnétiques revêtues de streptavidine, le complexe Ac-Ag-Ac est lié grâce à l’interaction streptavidine-biotine. Le mélange est transféré dans la cellule de mesure et les microparticules sont retenues à la surface d’une électrode par un aimant. L’application d’un voltage induit l’émission chimiluminescente mesurée.

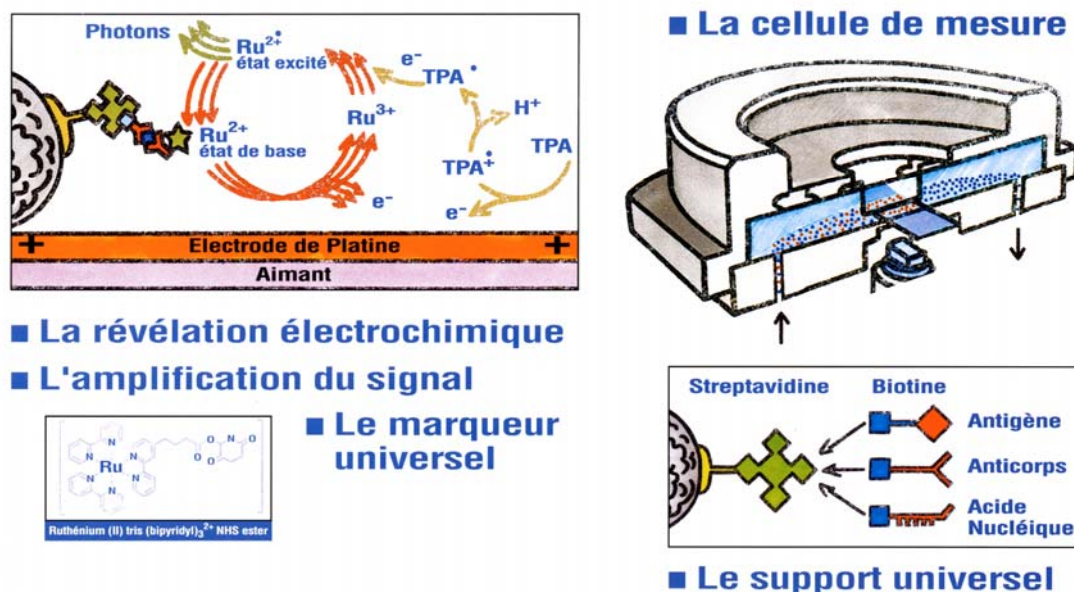


Figure 10 : principe du dosage de la troponine T sur ELECSYS® (d'après documentation Roche Diagnostics)

Ces nouvelles techniques semblent très spécifiques et très rapides (délai de réponse du test : 9 minutes), donc adaptées à l'urgence. Ainsi on peut dire qu'au cours de l'insuffisance rénale chronique, une élévation de cTNT mesurée avec cette trousse provient bien du myocarde. Ceci est en accord avec la constatation, chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique en phase terminale, surtout chez les hémodialisés, d'une prévalence accrue d'ischémie cardiaque infra clinique (BUGNANI et LAPERCHE, 1995).

La limite de détection se situe à 0,01 µg/L. La valeur seuil décisionnelle est fixée à 0,1µg/L par Roche mais il semble que ce soit une valeur supérieure à celle donnée par la courbe ROC (Receiver Operating Characteristic curve) afin d'augmenter la spécificité du test (HETLAND et DICKSTEIN, 1998).

Au delà de ces valeurs, on pourra affirmer ou infirmer l'existence de lésions myocardiques ischémiantes.

Chez l'individu sain, de petites quantités de TNT sont détectées (< 0,1 µg/L).

2) Cinétique

L'allure de la courbe de libération de la cTNT au cours du temps est biphasique. La concentration de la TNT augmente vers la troisième heure (3 à 12 h) après le début de la nécrose. Un premier pic a lieu entre la 12^{ème} et le 24^{ème} heure, suivi d'une phase de décroissance. Puis un deuxième pic apparaît plus tardivement vers le 5^{ème} jour. Des taux significatifs persistent au delà du 10^{ème} jour (LAPERCHE *et al*, 1995).

Cette cinétique particulière peut s'expliquer par la répartition de la molécule dans le myocarde. Le premier pic correspondrait à la libération de la cTNT provenant d'un pool cytosolique (6% de la TNT), qui serait une réserve pour la synthèse de TNT myofibrillaire. Le second pic serait dû à la fuite de troponine faisant suite à la lyse de l'appareil myofibrillaire (LAPERCHE et JUIN, 1996).

III - Méthodes de dosage de la troponine I

1) ACCESS® : Méthode Sanofi Diagnostics Pasteur

La méthode ACCESS® est une technique automatisée d'immunoenzymochimiluminescence de type "sandwich" à particules paramagnétiques, utilisant deux anticorps monoclonaux de souris, spécifiques de l'isotype cardiaque de la troponine I, révélés par le couple phosphatase alcaline / phosphate de dioxetane.

La lumière générée par la réaction est mesurée à l'aide d'un luminomètre. La production de photons est proportionnelle à la quantité du conjugué enzymatique présent à la fin de la réaction.

Méthode sandwich

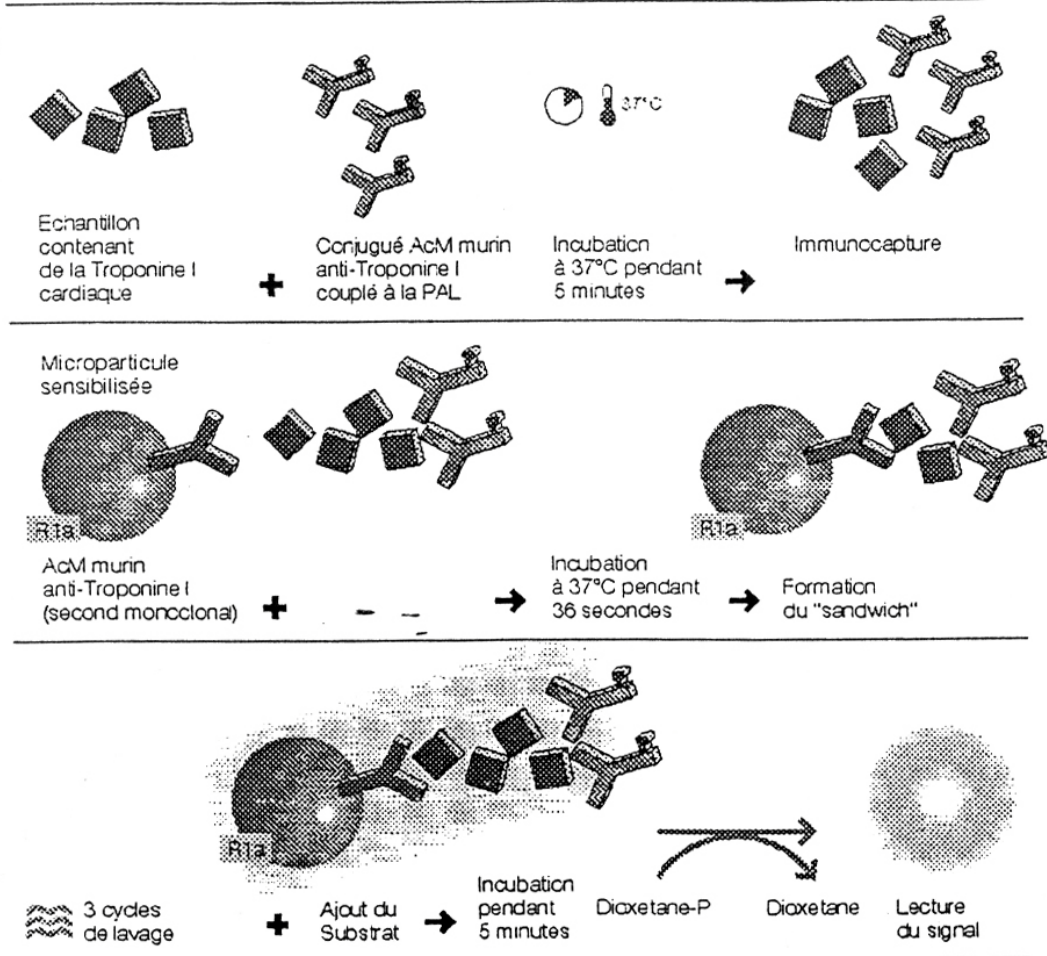


Figure 11 : principe du dosage de la troponine I sur ACCESS® (d'après documentation Beckman Coulter)

50 µL d'échantillon sérique sont utilisés pour chaque dosage. Les résultats des échantillons sont rapportés en µg/L.

Le test est réalisé à 37°C et le résultat est disponible en 15 minutes.

Il est rendu dans un intervalle de valeurs compris entre 0.03 et 50 µg/L (donc au delà de 50 µg/L il est nécessaire de diluer)

Il n'y a pas « d'effet crochet » discernable jusqu'à 600 µg/L.

Il convient d'éviter d'utiliser des échantillons présentant un trouble important ou la présence de pigments héminiques (> 6 g/L de triglycérides, > 5 g/L d'hémoglobine, > 110 mg/L de bilirubine).

La valeur seuil au dessus de laquelle un échantillon sera considéré comme positif pour le diagnostic de l'IDM est de 0,5 µg/L. Cependant, la notice d'utilisation

ACCESS° précise que les patients souffrant d'une atteinte myocardique précoce pourront présenter des taux de troponine Ic dans une " zone grise " située entre 0,04 et 0,5 µg/L et devront donc être reprélevés une à deux heures après le premier prélèvement.

2) AXSYM system® : Méthode Abbott

Le dosage est lui aussi basé sur une méthode M.E.I.A. (Microparticle Enzyme Immuno Assay).

L'échantillon et les microparticules recouvertes d'anticorps anti-troponine Ic monoclonaux de souris sont incubés ensemble dans un puits de la cartouche de réaction ; ils y forment des complexes antigène-anticorps. Puis une partie aliquote de ce mélange est transférée sur la matrice en fibres de verre. Les microparticules s'y lient irréversiblement.

La matrice est lavée pour éliminer le matériel non-lié.

Le conjugué (Ac polyclonal de chèvre) est ensuite distribué sur la matrice et se lie à la troponine Ic du complexe antigène-anticorps fixé sur la matrice, pour former le " sandwich " ou complexe anticorps-antigène-anticorps.

La matrice est lavée afin d'éliminer le conjugué non lié.

La phosphatase alcaline (AP), fixée sur le conjugué, va permettre la libération du produit fluorescent méthylumbelliférone (MU) dès l'addition du substrat phosphate de methyl-4-umbelliférone (MUP)) sur la matrice.

Le signal fluorescent mesuré par le système optique est directement proportionnel à la quantité de troponine Ic de l'échantillon.

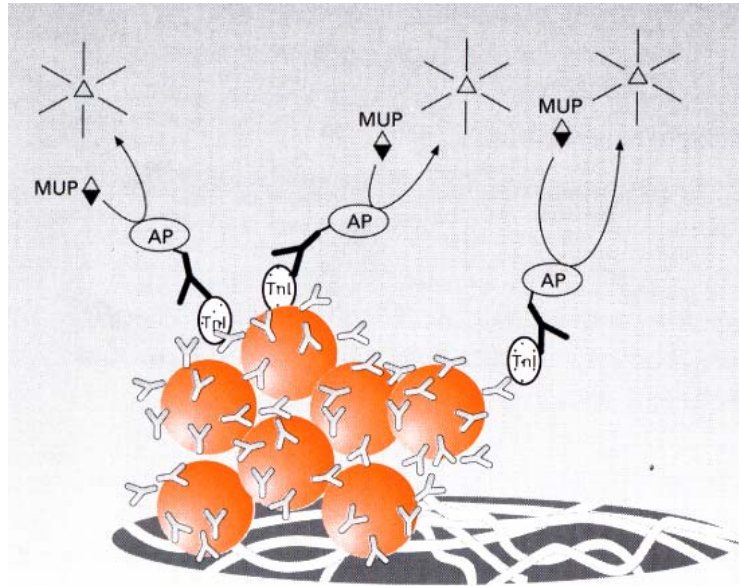


Figure 12 : principe du dosage de la troponine I sur AXSYM® (d'après documentation Abbott)

Il faut s'assurer de la formation complète du caillot avant centrifugation et ne pas prélever dans la couche de lipides à la surface en cas d'échantillon lipémique.

220 μL de sérum ou plasma hépariné sont nécessaires dans le godet échantillon.

La valeur seuil de diagnostic pour les patients présentant un infarctus du myocarde a été déterminée comme étant égale à 2,0 $\mu\text{g/L}$. Elle exclue les patients ayant un diagnostic d'angor stable ou instable.

De plus, la valeur attendue chez des patients apparemment sains serait $< 0,5 \mu\text{g/L}$.

La sensibilité avec ce cut-off est de 91,8% et la spécificité de 92,4% (APPLE *et al*, 1999).

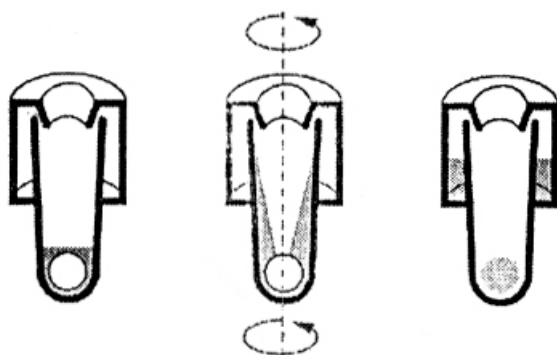
Lors de l'étude d'interférences potentielles provoquées par divers médicaments ou des concentrations élevées en bilirubine, hémoglobine, globules rouges, cholestérol et triglycérides, ce dosage n'a présenté que des variations $< 10\%$.

De même, certaines situations cliniques telles que des lésions musculaires squelettiques, une insuffisance rénale chronique, une intervention chirurgicale effectuée le même jour, qualifiées de situations potentiellement interférentes, n'ont pas affecté la spécificité du dosage avec cette valeur seuil diagnostique.

3) **IMMULITE® : méthode DPC**

La trousse IMMULITE® Troponine I est un immunodosage chimiluminescent en phase solide. La phase solide, une bille de polystyrène contenue dans l'unité-test, est revêtue d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de la troponine I.

Le sérum du patient et un anticorps polyclonal de chèvre marqué à la phosphatase alcaline sont introduits simultanément dans l'unité-test et incubés (6 minutes à 37°C sous agitation intermittente). Il y a formation du complexe sandwich. Le conjugué non-lié est éliminé ensuite par un lavage utilisant le principe de la centrifugation axiale.



Associée aux performances de la chimiluminescence, l'utilisation de ce procédé permet la réduction du bruit de fond ("non specific binding") et donc l'obtention de seuils de détection très bas.

Figure 13 : principe du lavage par centrifugation axiale sur IMMULITE® (d'après documentation DPC)

Le substrat est ensuite ajouté dans l'unité-test. C'est un ester d'adamantyl dioxetane phosphate qui est hydrolysé par la phosphatase alcaline en un anion intermédiaire instable.

La production continue de cet anion au cours de l'hydrolyse permet une émission prolongée de lumière augmentant ainsi la précision du dosage par la réalisation de plusieurs mesures successives.

Cette quantité de lumière émise est proportionnelle à la concentration de troponine I dans l'échantillon.

La conjugaison Dioxétane/Phosphatase alcaline permet d'atteindre une sensibilité de 10^{-21} moles et d'obtenir une émission lumineuse prolongée.

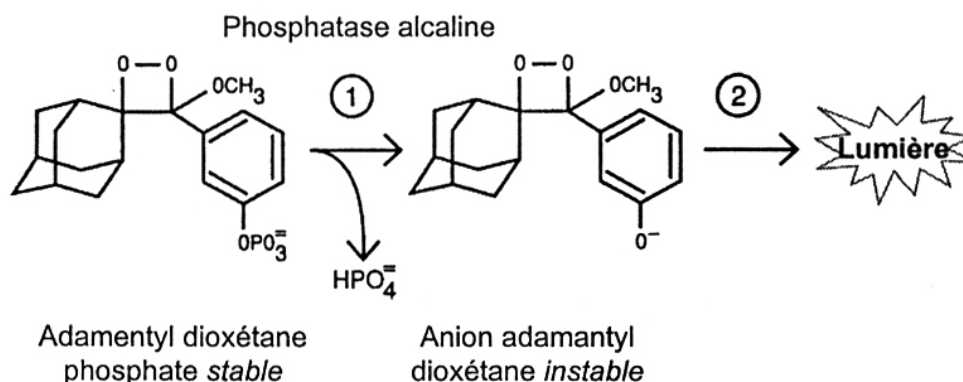


Figure 14 : principe de la réaction de chimiluminescence sur IMMULITE® (d'après documentation DPC)

50 μ L d'échantillon (ou 100 μ L pour la version "turbo" du dosage) sont nécessaires. Cependant, il est impératif d'introduire un volume de 250 μ L supplémentaire (volume mort) sur un godet échantillon (plasma hépariné, EDTA, ou sérum).

Le dosage s'effectue en 15 minutes pour la méthode "turbo", et 40 minutes pour la méthode de routine.

Le domaine de mesure s'étend de 0,2 à 180 μ g/L (pour les valeurs supérieures une dilution s'impose).

L'hémolyse n'interagit pas sur le dosage. En revanche, l'hyperbilirubinémie donne des valeurs diminuées, et il est nécessaire de clarifier les sérum hyperlipémiques. Il n'a pas été montré d'interférence lors de situations cliniques telles que rhabdomyolyse ou insuffisance rénale chronique.

Cette méthode ne présente pas d'"effet crochet" pour des concentrations de troponine I jusqu'à 11000 μ g/L.

La valeur seuil décisionnelle est donnée à 1,0 μ g/L.

Cependant, au cours d'une étude réalisée par B.Cauliez et A.Lavoine en Décembre 1999, il a été proposé deux seuils (CAULIEZ et LAVOINNE, 2000) :

Seuil de normalité : <1,0 µg/L

Seuil décisionnel d'IDM : 2,7 µg/L

4) **ACS 180® : méthode Bayer Diagnostics**

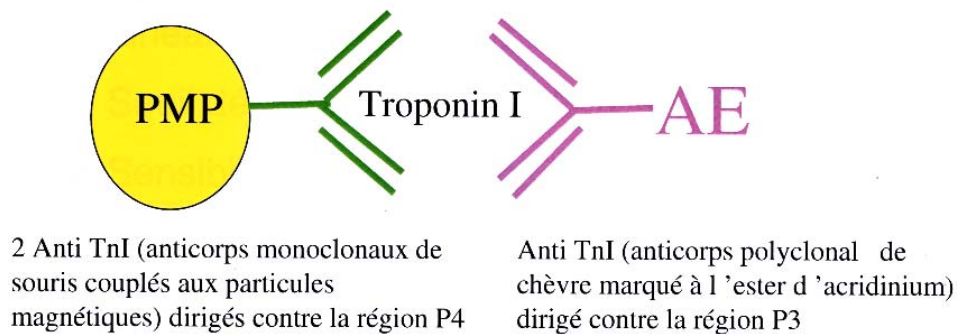


Figure 15 : principe du dosage de la troponine I sur ACS :180® (d'après documentation Bayer Diagnostics)

Le dosage ACS :180® de la troponine Ic est un immunodosage “sandwich” utilisant une technique chimiluminescente directe et des quantités constantes de deux anticorps :

Le premier est un anticorps polyclonal de chèvre anti-troponine I marqué à l'ester d'acridinium. Il est mis à incuber avec le sérum échantillon dans une cuvette réactionnelle.

Le second anticorps est ajouté : il s'agit d'un anticorps monoclonal de souris anti-TnIc, couplé de façon covalente à des particules paramagnétiques (phase solide). Après déplacement de la cuvette dans un champ magnétique, l'automate aspire et lave l'excédent de réactif non retenu à la phase solide.

La cuvette est alors transférée dans la chambre du luminomètre et les réactifs déclenchants (1 et 2) (KOH diluée) sont injectés afin d'initier la réaction de chimiluminescence : il y a mesure de la quantité de photons émis et conversion en résultats par algorithmes de calcul.

100 µL de sérum sont nécessaires au dosage.

Le résultat est rendu en 15 minutes.

La valeur seuil pour le diagnostic des patients atteints d'un infarctus du myocarde a été déterminée à 1,5 µg/L par le fabricant.

La sensibilité est de 94,6%.

La spécificité est de 98,8%.

Cependant la notice précise que chez les patients souffrant de troubles non-cardiaques, on trouve une valeur médiane inférieure à la concentration minimale détectable du dosage ou valeur usuelle, soit 0,10 µg/L (BAKKOUCH *et al*, 1999).

Nous choisirons la valeur seuil au delà de laquelle il y a souffrance myocardique.

On peut préciser que dans une étude multicentrique, une valeur supérieure ou égale à 0,10 µg/L chez des patients souffrant de syndromes coronariens aigus était corrélée à un risque accru de mortalité ou de morbidité (MORROW *et al*, 2000). On peut travailler sans dilution jusqu'à 50 µg/L.

Il n'a pas été observé « d'effet crochet » jusqu'à 1000 µg/L.

Le fournisseur met en garde contre l'utilisation du plasma hépariné qui peut donner des biais négatifs pouvant aller jusqu'à 14% par rapport au dosage sur sérum.

De même les échantillons ne doivent pas rester plus de 4 heures à température ambiante avant dosage, et doivent être congelés si ce dernier est différé plus de 24 heures.

Les anticorps hétérophiles potentiellement présents dans le sérum humain peuvent réagir avec les immunoglobulines des réactifs, induisant des valeurs anormales.

L'hémolyse (jusqu'à 4 g/L d'hémoglobine), les sérums lipémiques (jusqu'à 10 g/L de triglycérides), ictériques (jusqu'à 400 mg/L de bilirubine libre ou conjuguée) ou protéinémiques (jusqu'à 125 g/L de protides), ne modifient pas les résultats de plus de 5%.

5) DIMENSION RxL-HM® : méthode Dade Behring

C'est une méthode d'immunodosage « sandwich » en une étape

L'originalité du système DIMENSION® consiste en l'ajout d'un module hétérogène entre la zone échantillon et la zone réactionnelle. Ce module comprend un

réservoir de cuvettes à usage unique, un convoyeur, une roue d'incubation, une roue de lavage.

Les cuvettes sont acheminées vers la roue d'incubation où sont distribuées les particules de dioxyde de chrome (CrO_2) recouvertes d'anticorps anti-troponine Ic monoclonaux murins, puis l'échantillon à doser, et enfin le second anticorps monoclonal de souris anti-troponine marqué à la phosphatase alcaline.

Après incubation, chaque cuvette réactionnelle est déplacée vers la roue de lavage : il y a alors séparation magnétique du conjugué non-lié et transfert vers une cuvette thermosoudée du module de lecture où une cascade de réactions enzymatiques est utilisée pour amplifier le signal d'un facteur 100.

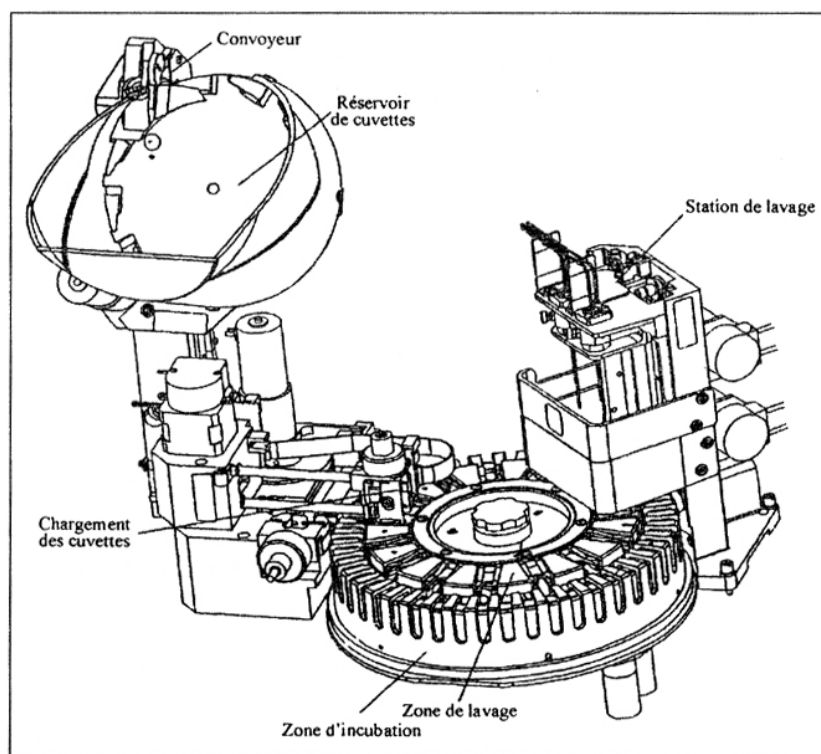
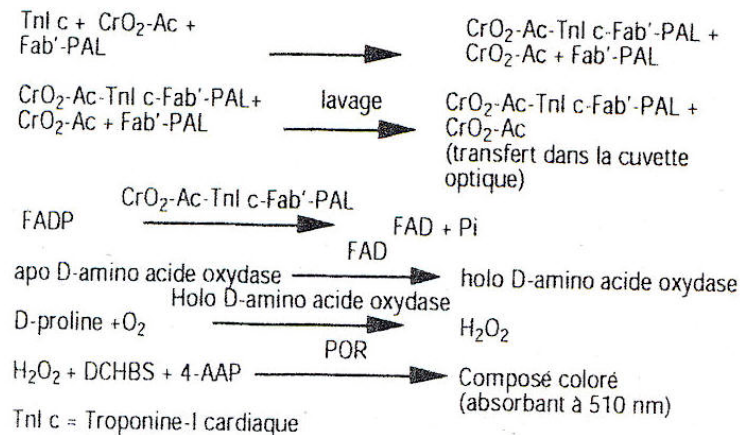


Figure 16 : schéma du module hétérogène du système DIMENSION-RXL® (d'après documentation Bayer Diagnostics)

La phosphatase alcaline déphosphoryle le FADP (Flavine Adénine Dinucléotide Phosphate) en FAD qui se lie à l'apoD-aminoacide oxydase pour former une oxydase active (holoD-aminoacide oxydase active). Cette enzyme produit de nombreuses

molécules de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui, en présence de peroxydase de Raifort (POR), oxyde l'acide 3,5-DiChloro-2-Hydroxy Benzène Sulfonique (DCHBS) et la 4-Amino Antipyrine (4-AAP) en composé coloré qui absorbe à 510 nm.

Le changement de couleur mesuré est directement proportionnel à la concentration de la troponine Ic présente dans l'échantillon du patient.



Avec 50 μ L d'échantillon, le résultat est obtenu en 15 minutes.

L'utilisation de plasma hépariné est recommandée mais le sérum peut être utilisé.

Aucune interférence significative n'a été observée ce qui témoigne de la résistance de la réaction enzymatique en cascade aux interférences d'origine hémolytique et lipidique.

La limite de détection analytique est de 0,05 μ g/L et la technique est linéaire jusqu'à 40 μ g/L.

L'intervalle de référence du sujet indemne est de $<0,1\ \mu$ g/L (99^{ème} percentile).

Le seuil de nécrose myocardique est donné à $>1,5\ \mu$ g/L.

6) VITROS Eci® : méthode Ortho Clinical Diagnostics

Le principe du système VITROS Eci® repose sur une capture immunologique des antigènes à doser en phase hétérogène suivie d'une révélation par chimiluminescence amplifiée.

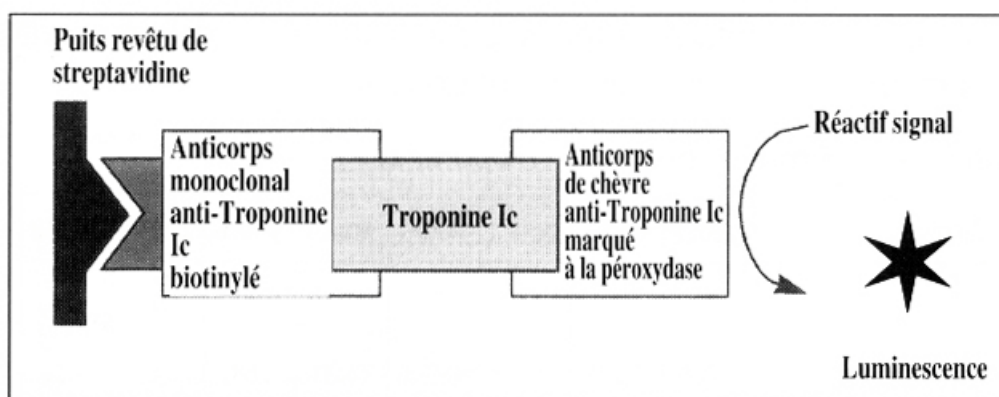


Figure 17 : principe du dosage de la troponine I sur VITROS ECI® (d'après documentation Ortho Diagnostics)

Le premier anticorps (Ac monoclonal de souris) est biotinylé et le deuxième ou conjugué (Ac polyclonal purifié de chèvre) est marqué à la peroxydase de raifort (HRP). Ces complexes Ac-Ag-Ac sont fixés à la paroi de micropuits revêtus de streptavidine et sont ainsi séparés par lavage de l'excédent. Un réactif contenant les substrats luminescents (un dérivé du luminol et un sel peracide) et un agent de transfert d'électrons est ajouté au puits. La peroxydase catalyse la réaction d'oxydation du phtalhydrazide (dérivé du luminol).

Le signal lumineux émis est amplifié et prolongé par l'agent de transfert d'électrons (acétanilide substitué) puis mesuré à 470 nm par un luminomètre.

Le volume d'échantillon nécessaire est de 50 µL.

Les échantillons prélevés sur héparinate de lithium et de sodium peuvent être utilisés. Ils peuvent être conservés jusqu'à 3 jours entre 2 et 8°C ou 4 semaines à -20°C.

Des anticorps hétérophiles tels que les Ac humains anti-souris (HAMA) ne modifient pas les dosages pour un taux maximum d'HAMA de 2976 µg/L.

L'hémoglobine interfère sur le dosage en le majorant de 10 à 30 %. En revanche, la bilirubine n'interfère avec celui-ci que pour moins de 10 %.

La gamme de mesure va du seuil négatif de 0,1 µg/L à 100 µg/L.

Le résultat est rendu en 8 minutes.

La limite haute de référence (URL :Upper Référence Limit) pour les sujets normaux à été établie à 0,08 µg/L : c'est la limite supérieure de l'intervalle de confiance à 90 % du 99^{ème} percentile.

Le seuil d'IDM est donné à $> 0,4 \mu\text{g/L}$ (courbe ROC (Receiver Operator Characteristic)).

7) **KRYPTOR®: méthode Brahms**

Cette méthode met en jeu un autre concept d'immunodosage : TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission), qui permet de doser en phase homogène tout type de molécule.

Le dosage par TRACE est basé sur un transfert d'énergie non-radioactif, amplifié, entre un donneur et un accepteur lorsque ceux-ci sont engagés dans une réaction immunologique.

Les cryptates de terres rares, molécules en forme de cage contenant un ion de terre rare (ici l'Europium : Eu^{3+}), sont caractérisés par la grande longévité de leur fluorescence et par leur stabilité cinétique et thermodynamique très élevée, même en milieu biologique.

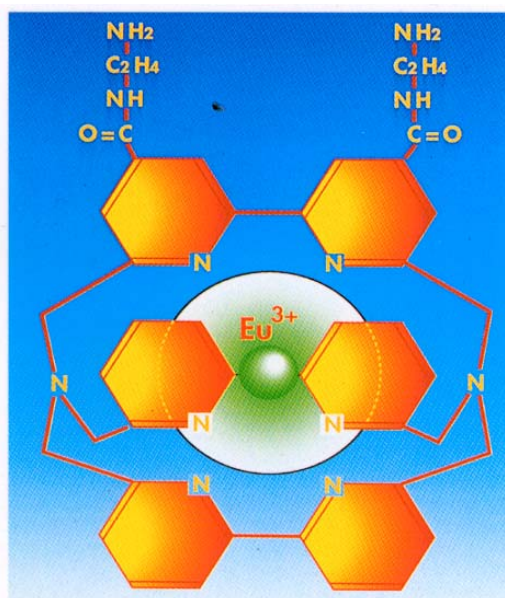


Figure 18 : schéma de principe de la technologie TRACE (d'après documentation Brahms)

L'utilisation d'un cryptate d'Europium (donneur d'énergie) comme marqueur fluorescent à longue durée de vie dans les immuno-dosages garantit des performances analytiques comparables à celles obtenues avec les méthodes de référence actuelles.

Ce cryptate peut être conjugué à des anticorps, des antigènes ou des haptènes sans altération de leur immunoréactivité (ici un anticorps anti-troponine). Dans le dosage, le donneur, l'Europium trisbipyridine diamine [TBP(Eu³⁺)] est conjugué à un anticorps qui est hautement spécifique de la troponine Ic. L'accepteur, le fluorophore XL665- une phycobiliprotéine chimiquement modifiée extraite d'algues rouges – est fixé à un second anticorps lui aussi hautement spécifique de la troponine Ic à doser.

Pendant l'incubation à 37°C, le complexe immunologique “sandwich” est excité par un laser à 337 nm. L'énergie amplifiée par transfert du cryptate d'Europium (donneur) au fluorophore (accepteur) émet un signal à longue durée de vie mesuré à 665 nm

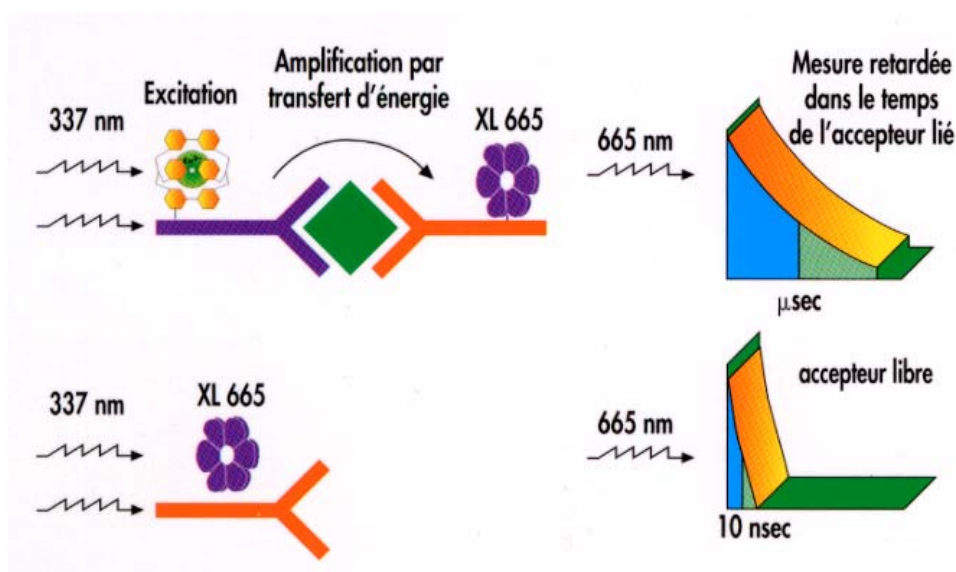


Figure 19 : principe du dosage de la troponine I sur KRYPTOR® d'après documentation Brahms)

Cette lecture a pour particularité d'être retardée dans le temps et bichromatique : la lecture simultanée du signal à 620 nm et à 665 nm débute 50 μs après chaque impulsion laser et dure 400 μs. Ce délai assure l'élimination de la fluorescence des composants endogènes de l'échantillon et celle de l'accepteur non lié.

Pour calculer la concentration en troponine Ic de l'échantillon, on utilise le rapport entre les signaux émis à 665 nm et à 620 nm (ou référence interne).

Ce dosage nécessite une prise d'essai de 50µL (prévoir en plus un volume mort et une éventuelle dilution).

Le résultat est rendu en 19 minutes sur plasma hépariné ou sérum.

La limite de détection est à 0,15 µg/L et va jusqu'à 200 µg/L sans dilution.

Il n'a pas été noté d'interférence (insuffisants rénaux, facteur rhumatoïde jusqu'à 640 UI, ni avec les sérums hyperlipémiques jusqu'à 8 g/L, ou ictériques jusqu'à 60 mg/L de bilirubine, ou hémolysés jusqu'à 7,5 g/L d'hémoglobine).

La valeur seuil de normalité (99^{ème} percentile) est fixée à 0,29 µg/L.

8) **LIAISON® : méthode Diasorin**

C'est une méthode immunoluminométrique classique en une étape utilisant des microparticules magnétiques (phase solide) revêtues d'anticorps anti-troponine Ic de souris (Ac de capture), de nature monoclonale.

Un Ac polyclonal anti-troponine Ic de chèvre est utilisé comme conjugué.

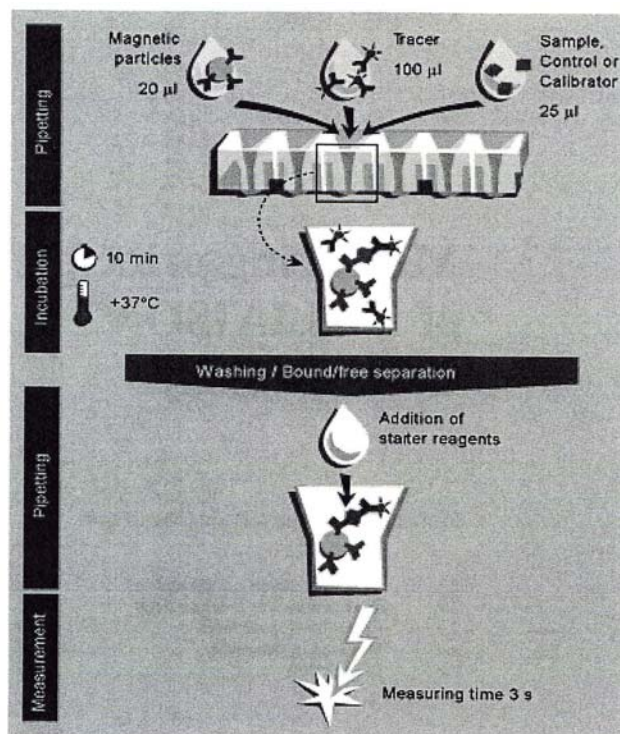


Figure 20 : principe du dosage de la troponine I sur LIAISON® (d'après documentation Diasorin)

100 µL de sérum sont nécessaires. Le plasma hépariné donne des valeurs plus basses de 25 à 30% et le plasma EDTA des valeurs augmentées d'environ 15%.

Conservation préconisée : 24 heures à température ambiante, 7 jours entre 2 et 8°C, au-delà, congélation à -20°C.

La limite de détection est de 0,005 µg/L. le "cut-off" (99^{ème} percentile d'une population normale) est à 0,03 µg/L (plasma hépariné : <0,03, EDTA : <0,04).

Il n'est pas signalé d'interférences, ni avec la bilirubine (< 0,125 g/L), ni avec l'hémoglobine (< 5 g/L), ni avec les triglycérides (<12,5 g/L).

Des échantillons contenant des Ac anti-souris (HAMA) peuvent donner des résultats faussement augmentés ou abaissés. Bien que des agents bloquants soient ajoutés au réactif, les concentrations extrêmement élevées en HAMA peuvent fausser les résultats.

Un " effet crochet " se manifeste à partir de 1000 µg/L.

Domaine de linéarité : 0,005 à 100 µg/L.

9) VIDAS® : méthode Biomérieux

Cette méthode a pour originalité de se réaliser en tests unitaires composés d'une part d'un cône en polystyrène tapissé d'anticorps et operculé par une pastille colorée perforée en son centre, et d'autre part d'une cartouche, elle aussi à usage unique, composée de 10 puits contenant tous les réactifs prêts à l'emploi, recouverts d'une feuille d'aluminium scellée et d'une étiquette (code barre, numéro de lot, date de péremption...).

Le principe de dosage associe la méthode immunoenzymatique " sandwich " en une étape à une détection finale en fluorescence (ELFA).

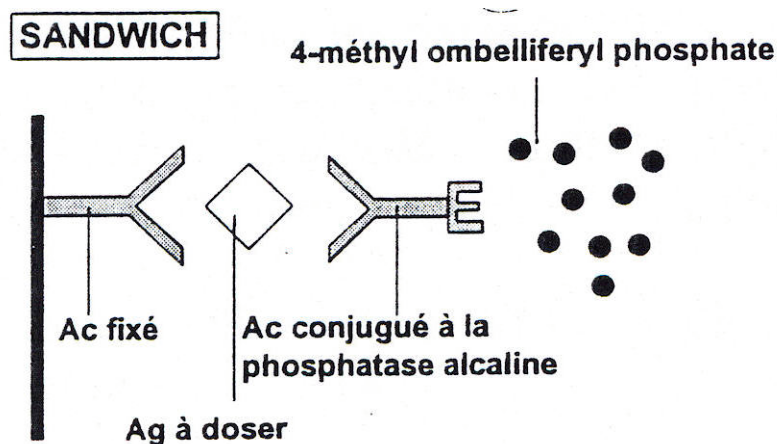


Figure 21 : principe du dosage de la Troponine I sur VIDAS® (d'après documentation Biomérieux)

Le cône à usage unique sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. Il est sensibilisé au moment de la fabrication par des immunoglobulines monoclonales de souris anti-troponine I cardiaque. Les autres réactifs de la réaction immunologique sont prêts à l'emploi et pré-répartis dans la "cartouche". Ce support de pipetage de l'échantillon et des réactifs permet de n'avoir aucun contact entre fluide instrument, ce qui rend l'entretien négligeable puisqu'aucune tubulure, seringue ou bras de prélèvement n'existe.

Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement par l'appareil. L'échantillon déposé dans le premier puits est prélevé avec le cône, puis transféré dans le puits contenant le conjugué : anticorps anti-troponine I (polyclonal de chèvre) marqué à la phosphatase alcaline.

Ce mélange échantillon / conjugué est aspiré puis refoulé plusieurs fois par le cône. Cette opération permet à l'antigène de se lier d'une part, aux immunoglobulines fixées sur le cône, et d'autre part au conjugué, formant ainsi un sandwich. Des étapes de lavage éliminent les composés non fixés.

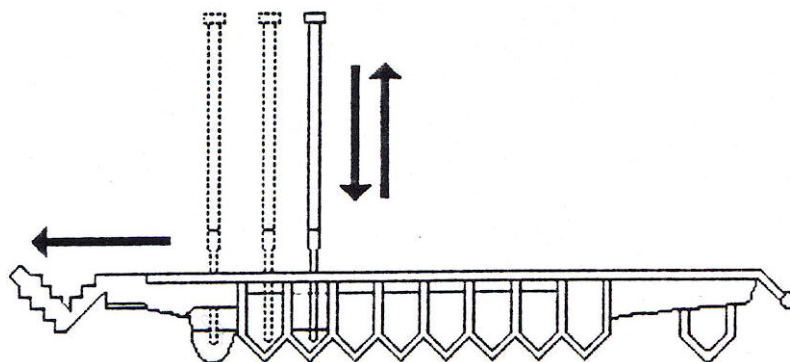


Figure 22 : schéma de la cartouche analytique du VIDAS® (d'après documentation Biomérieux)

Lors de l'étape finale de révélation, le substrat (4-méthyl-ombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé par le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-méthyl-ombelliférone) dont la fluorescence émise est mesurée à 450 nm. Cette valeur du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration de troponine présente dans l'échantillon. L'appareil effectue deux mesures de fluorescence dans la cuvette pour chaque test : la première pour prendre en compte le bruit de fond dû à la cuvette substrat, la deuxième après incubation du substrat avec l'enzyme du cône. La différence des deux mesures donne la RFV (Relative Fluorescence Value).

Le volume d'échantillon nécessaire est de 150 μ L (sérum ou plasma hépariné).

Le résultat est rendu en 15 minutes.

Il n'a pas été observé d'influence significative de l'hémolyse (jusqu'à 4,8 g/L d'hémoglobine), de la lipémie (jusqu'à 30 g/L d'équivalent triglycérides) ni de la bilirubinémie (jusqu'à 29 mg /L).

L'échantillon se conserve 48 heures entre 2 et 8°C, et 2 mois à -25°C.

La valeur seuil de normalité est déterminé comme étant $< 0,1 \mu\text{g/L}$.

La valeur décisionnelle de diagnostic de l'IDM est déterminée à $0,80 \mu\text{g/L}$ par courbe ROC.

10) AIA system® : méthode Tosoh

Le réactif AIA-Pack Troponin I° est un dosage immunoenzymométrique à deux sites, entièrement réalisé dans une même cupule-test.

La troponine Ic présente dans l'échantillon dosé se fixe à un anticorps monoclonal de souris anti-troponine I humaine immobilisé sur des microbilles magnétiques (Ac liant ou Ac de capture) et à un anticorps monoclonal de souris anti-troponine Ic humaine marqué à la phosphatase alcaline bovine (Ac marqué ou Ac de révélation), tous deux situés dans la cupule-test.

Après lavage des microbilles pour éliminer l'Ac marqué resté libre, celles-ci sont incubées avec un substrat fluorogénique (4-méthyl Umbelliférone Phosphate). Le signal fluorescent obtenu est directement proportionnel à la quantité d'anticorps marqué fixé donc à la concentration de troponine Ic présente dans l'échantillon.

La prise d'essai requise est de 50 µL de sérum ou de plasma hépariné ou EDTA.

Il est nécessaire de diluer à partir d'une concentration $> 120\mu\text{g/L}$ avec le diluant du coffret. Un phénomène d'“ effet crochet ” peut survenir au-delà de $30000\mu\text{g/L}$ de troponine.

Les échantillons peuvent être conservés à $2-8^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures avant analyse. Au-delà, ils doivent être congelés à -20°C .

La présence de fibrine peut donner des résultats faussement élevés ou diminués.

La présence d'auto-anticorps spécifiques dans les cas de myocardites et de cardiomyopathies dilatées ainsi que celle d'Ac humains anti-souris (HAMA) peuvent être responsables de résultats faussement positifs ou négatifs. Le test AIA° a été conçu pour minimiser l'effet de ces Ac hétérophiles sauf pour des concentrations très élevées.

L'hémoglobine (jusqu'à $4,36\text{ g/L}$), la bilirubine conjuguée (jusqu'à 186 mg/L) et la bilirubine libre (jusqu'à 165 mg/L) ne perturbent pas le dosage.

De même pour une hyperlipidémie (jusqu'à 20 g/L de triglycérides) ou une hyperprotidémie (albumine jusqu'à 50 g/l additionnée).

La limite de détection du test est de $0.02\mu\text{g/L}$.

Le 99^{ème} percentile a été déterminé à 0,06 µg/L (97,5 à 0,04 µg/L) et l'URL à 0,1 µg/L.

La valeur diagnostique seuil au dessus de laquelle un échantillon est considéré comme positif pour un IDM a été déterminée à 0,64 µg/L mais le fabricant conseille à chaque laboratoire d'établir sa propre valeur seuil et insiste sur le fait de toujours confronter un résultat avec la clinique du patient. Et on note aussi une “ zone grise ” entre 0,1 et 0,64 µg/L.

Le 99^{ème} percentile a été déterminé à 0,06 µg/L (97,5^{ème} à 0,04 µg/L) et l'URL à 0,1 µg/L

Fabricant	Appareil	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Ac fixé	Ac marqué	Produit mesuré	Temps dosage	Limite de normalité	Seuil IDM
		Volume (µL)	Nature	Stabilité(h)	Support	Marqueur	Mesure	(min)	(97,5 ou 99ème perc.)	(µg/L)
Beckman coulter	ACCESS®	50	Sérum	2h t° ambiante 24h 4°C >24h -20°C	Ac monoc. Souris Particules paramagnétiques	Ac monoc. souris phosphatase alcaline	sphate de dioxétane/photon chimiluminescence	15	97,5:0,03 99:0,04 z.grise:0,04-0,5	0,5
Abbott	AXSYM®	220	Sérum pl. hépar.	72h 2-8°C >72h -10°C	Ac monoc. souris Microparticules +fibres de verre	phosphatase alcaline	methyl umbelliféron /MUP chimiluminescence	13	99:<0,05 z.grise:0,5-1	2
DPC	IMMULITE®	50+250(mort) turbo 100	Sérum pl. hépar.	5j 2-8°C 1mois -20°C	Ac monoc. souris bille de polystyrène	Ac polycl. chèvre phosphatase alcaline	ester d'amantadyl dioxetane/anion chimiluminescence	40 (turbo 15)	99:<1	2,7
Bayer	ACS-180®	100	Sérum pl. hépar.	<4h t° amb 4-24h 2-8°C >24h -20°C	Ac monoc. souris Particules paramagnétiques	Ac polycl. chèvre ester d'Acridinium	ester d'Acridinium /photon chimiluminescence	15	99:<0,1	1,5
Dade-Behring	DIMENSION RxL-HM®	50	Sérum pl. hépar.	14j. 2-8°C >14j. -20°C	Ac monoc. souris particules dioxyde de Chrome	Ac monoc. souris Phosphatase alcaline	cascade enzymatique /510nm chimiluminescence	15	97,5:0,05 99:<0,1 z.grise:0,6-1,5	1,5
Ortho Clinical Diagnostics	VITROS-Eci®	75	Pl. hépariné	3j 2-8°C 1mois -20°C	Ac monoc. souris biotinylé Micropuits +streptavidine	Ac polycl. chèvre peroxydase de raifort	Phtalhydrazide +acetanilide/470nm imiluminescence amplifiée	8	97,5:0,04 99:0,06	0,4
Brahms	KRYPTOR®	50 (+vol. mort)	Sérum pl. hépar.	24h 2-8°C > 24h -20°C	Ac monoc. souris cryptate [TBP(Eu3+)]	Ac monoc. souris Fluorophore XL665	Complexe Ac-Ag-Ac Laser à 665nm et 620nm TRACE	9	99:<0,29	0,4
Diasorin	LIAISON®	100	Sérum (pl. hépar., pl.EDTA)	24h t° amb 7j 2-8°C > -20°C	Ac monoc. souris particules paramagnétiques	Ac polycl. Chèvre isoluminol	réactif starter ??? chimiluminescence	17	99:<0,03	/
Biomerieux	VIDAS®	150	Sérum pl. hépar.	48h 2-8°C <2mois -25°C	Ac monoc. Souris cône	Ac monoc. souris phosphatase alcaline	4 MUP/4MU /450nm chimiluminescence	15	99:<0,1	0,8
Tosoh	AIA®	50	Sérum pl. hépar et EDTA	24h 2-8°C 60j -20°C	Ac monoc. souris microbilles	Ac monoc. souris phosphatase alcaline	4MUP chimiluminescence	18	99,5:0,04 99,0:0,06 z.grise:0,1-0,64	0,64

Tableau 2 : synthèse des caractéristiques des systèmes proposés pour le dosage de la troponine I

3ème PARTIE :

ETUDE PERSONNELLE

3ème PARTIE : ETUDE PERSONNELLE

I - MATERIEL ET METHODES

1) Patients

Les échantillons provenaient de 136 patients admis dans le Service d'Accueil des Urgences de l'Hôtel Dieu, pour lesquels un dosage de troponine Ic avait été prescrit, et dont le résultat était pathologique.

Seul le premier prélèvement pour chaque patient a été utilisé pour cette étude, et les patients présentant un résultat $> 10 \mu\text{g/L}$ par la méthode ACCESS® ont été exclus (la méthode ACCESS® a en effet été considérée comme référence, du fait de son utilisation en routine au Laboratoire de Biochimie de l'Hôtel Dieu au moment de notre étude.), ceci afin d'éviter de fausser les statistiques.

Les prélèvements ont ensuite été congelés dans les heures qui ont suivi.

La notion de temps séparant le début de la douleur du moment du prélèvement aurait été intéressante dans l'objectif d'une comparaison de méthodes, malheureusement l'ensemble des données restait souvent incomplet ou imprécis, ne permettant pas d'intégrer ce paramètre.

Notre population finale se répartissait en 61 femmes et 52 hommes soit 113 patients.

L'âge moyen était plus élevé chez les femmes (79 ± 13 ans) que chez les hommes (73 ± 16 ans).

Pour chaque patient, une recherche de renseignements cliniques rétrospective a été effectuée en s'adressant au clinicien impliqué.

En fonction du diagnostic définitif attribué à l'épisode aigu, ces patients ont été classés en 6 catégories :

- Angor (n=13), dont 7 étaient qualifiés d'instable.
- Infarctus du myocarde (n=23).
- Cardiopathies non-ischémiques (SC) (n=17), pour l'essentiel des insuffisances cardiaques.
- Affections pulmonaires avec retentissement cardiaque (SP) (n=30), dont embolies pulmonaires (n=6), poussées d'insuffisance respiratoire aiguë sur insuffisance respiratoire

chronique (n=6), et pneumopathies aiguës (n=5) auxquelles ont été rajoutés 13 oedèmes aigus du poumon (OAP).

- Etats de choc (n=14).
- autres (n=16), dont insuffisance rénale, traumatismes, brûlés, AVC.

2) Techniques de dosage

Elles ont été décrites dans la deuxième partie consacrée aux méthodes de dosage de la troponine Ic proposées sur le marché.

Trois méthodes ont été testées sur ces 113 sérums de patients provenant de l'accueil des Urgences du CHRU de Nantes :

- La méthode sur l'analyseur ACCESS® du laboratoire Beckman-Coulter
- La méthode sur l'analyseur KRYPTOR® de la société Brahms
- La méthode sur l'analyseur LIAISON® du laboratoire Dia Sorin

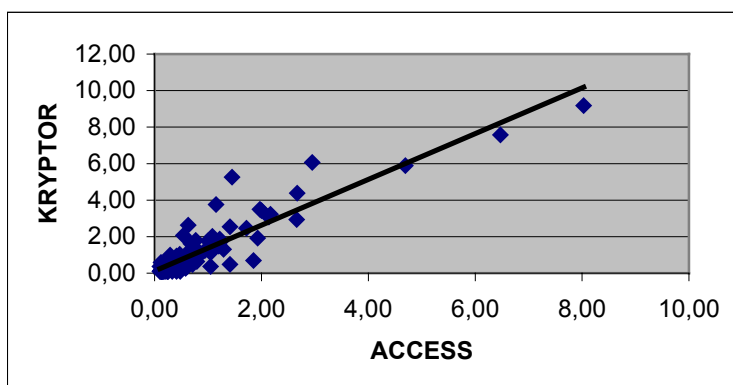
II RESULTATS

1) Résultats globaux

- KRYPTOR®-ACCESS® :

La droite d'allométrie nous donne :

$$\text{KRYPTOR®} = 1,372 \text{ ACCESS®} + 0,024$$

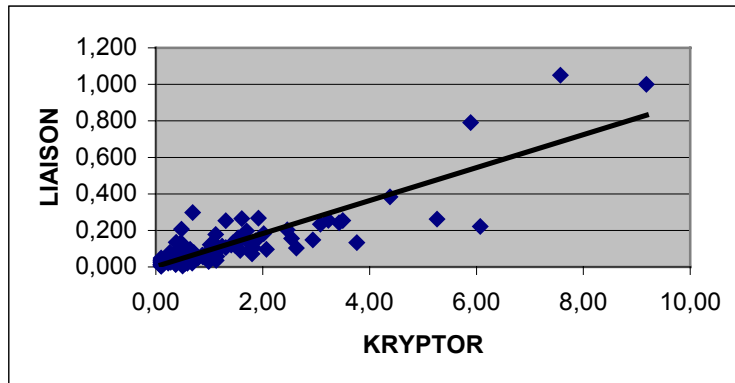


Cette comparaison globale montre des résultats légèrement plus élevés avec KRYPTOR® qu'avec ACCESS®. Il existe une certaine dispersion se traduisant par un coefficient de corrélation $r = 0,913$.

- KRYPTOR®-LIAISON® :

La droite d'allométrie calculée ici montre une échelle de progression des valeurs totalement différente entre les 2 méthodes avec pratiquement un facteur de 1 à 10 pour chaque couple de données.

$$\text{LIAISON}^{\text{®}} = 0.090 \text{ KRYPTOR}^{\text{®}} + 0,003$$

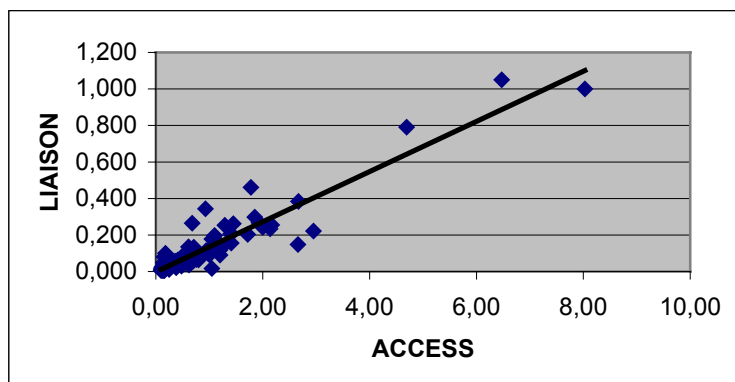


La dispersion y est plus importante que pour la précédente comparaison, avec un coefficient de corrélation $r = 0,870$.

- $\text{LIAISON}^{\text{®}}$ - $\text{ACCESS}^{\text{®}}$:

La droite d'allométrie est semblable à celle obtenue pour $\text{LIAISON}^{\text{®}}$ - $\text{Kryptor}^{\text{®}}$, les échelles de résultats étant toutefois plus proches :

$$\text{LIAISON}^{\text{®}} = 0,142 \text{ ACCESS}^{\text{®}} - 0,011$$



C'est pour cette troisième confrontation que nous obtenons le meilleur coefficient de corrélation $r = 0,940$.

2) Patients victimes d'IDM (n=23)

Nous obtenons les 3 droites d'allométrie suivantes :

$$\text{KRYPTOR}^{\text{®}} = 1,149 \text{ ACCESS}^{\text{®}} + 0,324$$

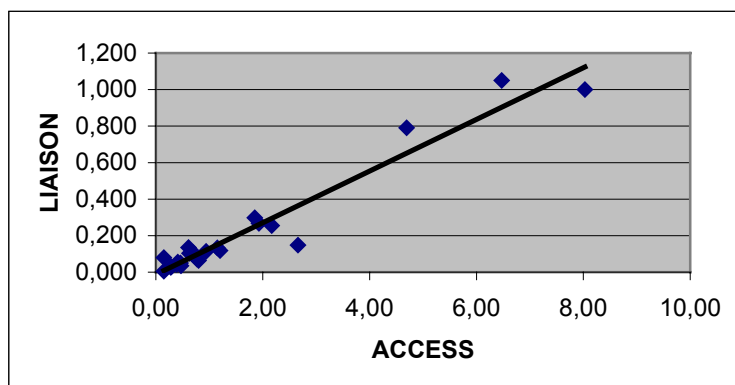
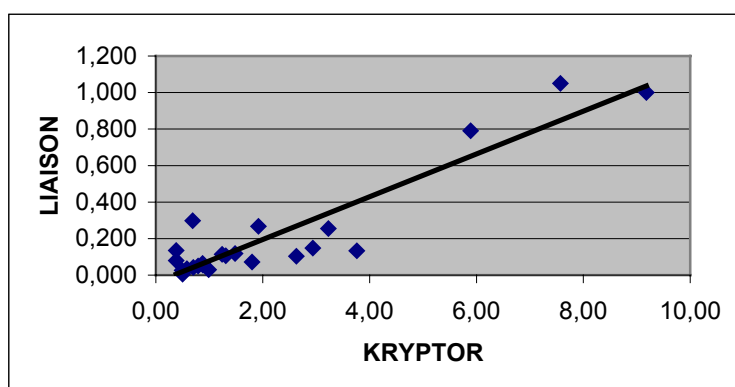
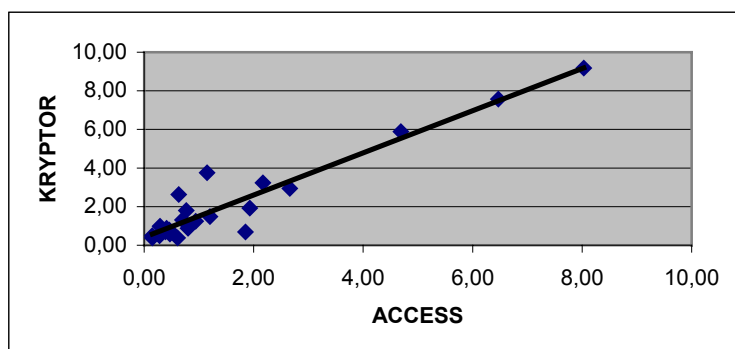
$$r = 0,951$$

$$\text{LIAISON}^{\text{®}} = 0,127 \text{ KRYPTOR}^{\text{®}} - 0,061$$

$$r = 0,922$$

$$\text{LIAISON}^{\text{®}} = 0,146 \text{ ACCESS}^{\text{®}} - 0,020$$

$$r = 0,969$$



Lorsque l'on isole les résultats obtenus chez les patients présentant un infarctus du myocarde, on observe une très sensible diminution de la dispersion et des valeurs, avec la méthodologie LIAISON[®], près de 7 fois plus faible que celle de l'ACCESS[®], et près de 8 fois plus faible que celle du KRYPTOR[®].

Malgré les mêmes différences de résultat reflétant des échelles de valeurs très différentes entre d'une part LIAISON[®] et d'autre part ACCESS[®] et KRYPTOR[®], nous avons ici de très bons coefficients de corrélation entre ces 3 méthodes ($r = 0,951$, $r = 0,922$, $r = 0,969$).

Elles semblent donc équivalentes en ce qui concerne le diagnostic positif de l'IDM.

3) Patients souffrant d'angor ou d'IDM (n=13+23)

L'effectif du groupe " Angor " était trop faible (n=13), et il existait fréquemment d'autres pathologies associées, rendant l'exploitation des résultats difficile.

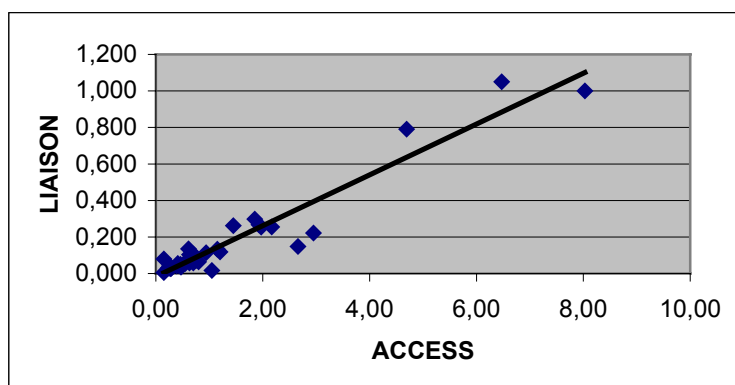
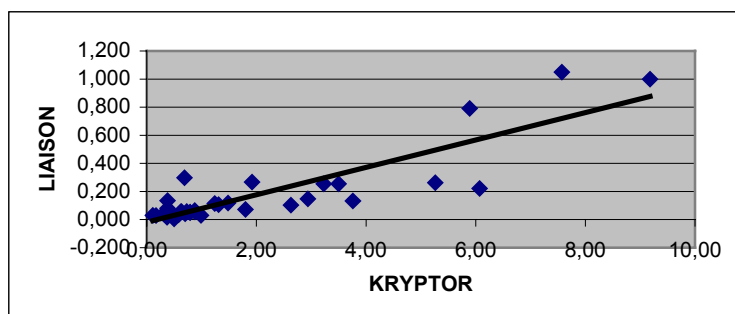
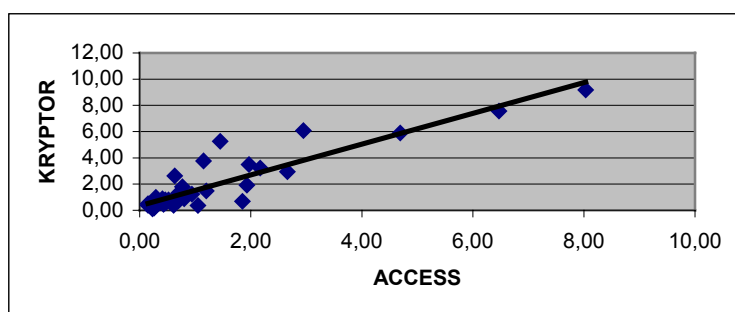
Nous avons alors décidé de créer un groupe « Patients souffrant d'ischémie myocardique », regroupant IDM et angor (n=36).

Soient les 3 droites d'allométrie suivantes :

$$\text{KRYPTOR}^{\text{®}} = 1,294 \text{ ACCESS}^{\text{®}} + 0,191 \quad r = 0,907$$

$$\text{LIAISON}^{\text{®}} = 0,112 \text{ KRYPTOR}^{\text{®}} - 0,046 \quad r = 0,870$$

$$\text{LIAISON}^{\text{®}} = 0,145 \text{ ACCESS}^{\text{®}} - 0,025 \quad r = 0,961$$



On retrouve des droites très semblables à celles calculées avec l'IDM seul, avec un peu plus de dispersion, imputable probablement au fait que les patients souffrant d'angor

présentaient souvent d'autres pathologies à leur entrée aux Urgences, ce qui rend les données diagnostiques plus difficiles à classer.

Cependant, nous pouvons constater l'homogénéité de réponse de chacune des 3 méthodes face à un évènement ischémique cardiaque.

4) S C + S P : cardiopathies non-ischémiques et affections pulmonaires aiguës avec retentissement cardiaque (n=47)

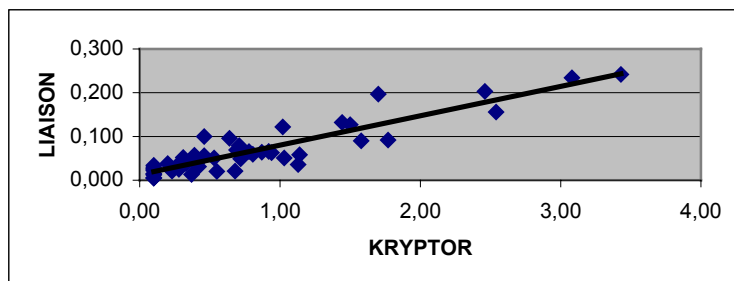
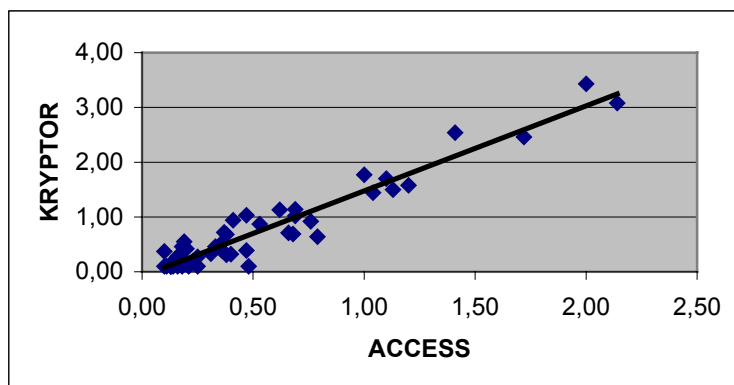
Les résultats obtenus chez les patients souffrant de cardiopathies non-ischémiques et chez ceux présentant des affections pulmonaires aiguës avec retentissement cardiaque sont similaires, c'est pourquoi nous avons associé ces 2 groupes.

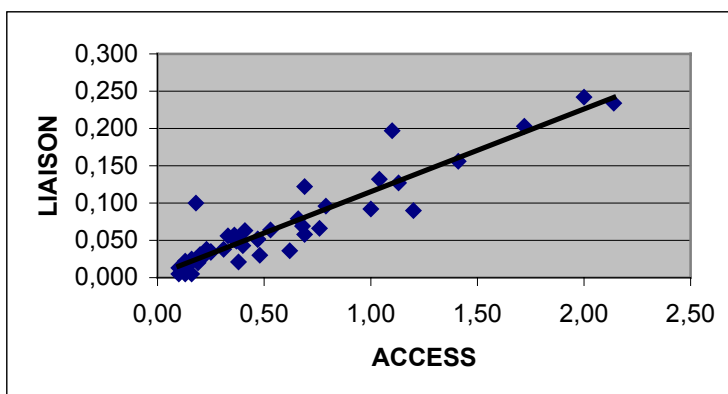
Comme l'indiquent les graphiques suivants, nous obtenons ces 3 droites d'allométrie :

$$\text{KRYPTOR}^{\text{®}} = 1,618 \text{ ACCESS}^{\text{®}} - 0,112 \quad r = 0,960$$

$$\text{LIAISON}^{\text{®}} = 0,074 \text{ KRYPTOR}^{\text{®}} + 0,008 \quad r = 0,912$$

$$\text{LIAISON}^{\text{®}} = 0,119 \text{ ACCESS}^{\text{®}} - 0,001 \quad r = 0,932$$





Ces droites sont assez semblables aux 3 du groupe « IDM », la “ pente ” s’étant accentuée entre KRYPTOR® et ACCESS® alors qu’elle était proche de 1 auparavant.

Ces 2 méthodes réagiraient différemment l’une de l’autre en cas de pathologie cardiaque non-ischémique et de pathologie pulmonaire avec retentissement cardiaque.

Cependant, le coefficient de corrélation entre ces 2 méthodes reste très bon ($r = 0,960$), ainsi que pour la comparaison de la méthode LIAISON® à la méthode KRYPTOR® ($r = 0,912$) ou ACCESS® ($r = 0,932$).

5) Autres pathologies (n=14+16)

Enfin les patients des 2 derniers groupes présentent des résultats un peu plus dispersés mais se rapprochant malgré tout des précédents. Ceci reflète la très grande hétérogénéité des mécanismes des lésions myocardiques observés.

Ils ne seront pas présentés ici.

III DISCUSSION

La comparaison de ces trois méthodes illustre bien les problèmes que génère la diversité des formes circulantes de la troponine I et l'absence de standardisation quant à son calibrage. Les deux phénomènes s'associent pour perturber les comparaisons inter-techniques. Ainsi, l'absence de standardisation aboutit pour l'essentiel à des niveaux de valeurs très différents entre les méthodes, de 1 à plus de 13 (entre KRYPTOR® ET LIAISON®) dans notre étude, mais pouvant aller jusqu'à plus de 100 (APPLE *et al*, 1999); les préparations utilisées pour le calibrage ne sont en effet pas représentatives des différentes formes circulantes retrouvées en pathologie (TATE *et al*, 2002 et ROBERT *et al*, 2001). Les seuils de normalité annoncés par les fabricants nous amènent également à nous interroger en plus du problème ci-dessus évoqué. Ainsi dans notre étude les seuils de l'ACCESS® (0,04µg/L) et du LIAISON® (0,03µg/L) sont très voisins alors que les niveaux de valeurs observés en pathologie varient de 1 à 8 tandis que celui du KRYPTOR® (0,29µg/L) est près de 10 fois plus élevé que celui de l'ACCESS® avec des résultats numériques proches en pathologie.

La troponine Ic est relarguée dans la circulation à la suite d'une lésion cardiaque sous différentes formes :

- formes libres (I)
- complexes binaires (I-C)
- complexes ternaires (I-T-C)
- formes oxydées ou réduites
- formes phosphorylées ou non
- formes ayant subi ou non un certain degré de protéolyse

Ces différentes formes de troponine I ne sont pas reconnues de manière identique par toutes les trousses (PRADIP *et al*, 1999). Cela est lié à une différence de reconnaissance des épitopes cibles par les différents anticorps monoclonaux. Par conséquent, pour assurer une détection sensible et reproductible de la TnIc sur les différents types d'échantillons, il est important d'utiliser un dosage qui puisse reconnaître la région la plus stable de la TnIc et assurer ainsi une reconnaissance équimolaire (équivalente) des différents isoformes.

De plus, il est vraisemblable que les formes de troponine I relarguées soient variables en fonction du mécanisme de la lésion myocardique. Ainsi dans la présente étude on observe des différences très nettes en fonction de pathologies ischémiques ou non (IDM vs SC+SP), la pente de la droite d'allométrie entre KRYPTOR® et ACCESS® augmente de plus de 40% entre le groupe IDM et celui des cardiopathies non ischémiques. Cela signifie une « réactivité » plus importante de la méthode KRYPTOR® dans ce dernier contexte. On assiste parallèlement à un phénomène inverse mais de moindre ampleur entre LIAISON® et ACCESS® (environ 20%). Il serait bien sûr utile de préciser ces différences par une étude comportant un nombre d'échantillons plus grand mais la très bonne corrélation entre les séries plaide fortement en faveur de cette thèse.

L'absence de corrélation entre méthodes peut également être partiellement attribuée au manque d'un standard international pour le dosage de la TnIc. Deux comités internationaux organisés par l'International Federation for Clinical Chemistry (IFCC) et l'American Association for Clinical Chemistry (AACC) s'occupent actuellement de la sélection du matériel le mieux adapté pour servir de Préparation Internationale de Référence. Même si une calibration basée sur un standard universel ne peut éliminer toutes les différences entre les méthodes, elle réduirait au moins la variabilité.(NEWMAN *et al*, 1999)

Les contrôles de qualité inter-laboratoires sont particulièrement révélateurs dans les différences entre les méthodes ; il y est impossible d'effectuer des comparaisons inter-techniques.

Pour exemple, nous avons repris les résultats d'un contrôle international de qualité inter-laboratoire de Janvier 2004 pour la troponine Ic :les résultats répondus varient en fonction de la méthode de 0,166µg/L (DIMENSION®) à 3,284µg/L (AXSYM®).

De plus, même si les différences observées ne sont pas extrapolables à ce qui se passe chez les patients, elles plaident largement pour la non-transférabilité des résultats.

CONCLUSION

CONCLUSION

On peut aisément comprendre la perplexité de certains de nos collègues cliniciens devant des résultats de troponine I (surtout s'ils correspondent avec plusieurs laboratoires d'analyses de biologie médicale), et encore nous n'avons pas abordé ici les facteurs de variations analytiques (variations inter- et intra-séries) et pré-analytiques (conditions de prélèvement et de conservation) qui peuvent être éminemment variables selon les fournisseurs. A titre d'exemple, dans certaines trousse, des diminutions de concentration de TnIc ont été observées en présence d'héparine en comparaison au sérum : il y aurait interaction entre l'héparine et la TnIc, qui empêcherait l'accès des anticorps à certains épitopes entraînant un dosage par défaut.

La troponine I doit donc dans l'état actuel des choses être pratiquement considérée comme un paramètre différent chez chaque fournisseur (quand il n'y a pas plusieurs troponine I chez le même !), et en changer devient ici une opération particulièrement délicate. Les comparaisons abondent dans la littérature, mais chaque site a ses propres spécificités et une évaluation personnelle en relation étroite avec les correspondants cliniciens paraît être une étape essentielle. Si une amélioration de la standardisation est possible et en tout cas souhaitable, un rapprochement des valeurs semble bien improbable du moins à court terme.

Donc s'il est un vœu que l'on peut ici formuler, c'est que l'histoire ne se répète pas, et que les futurs marqueurs ne soient pas sujets à une telle variabilité.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS J.E., SICARD G.A., ALLEN B.T. *et al.*

Diagnosis of perioperative myocardial infarction with measurement of cardiac Troponin I.
N. Engl. J. Med., 1994 ;330 :670-4

ALPERT J.S., ANTMAN E., APPLE F., ARMSTRONG P.W., BASSAND J.P., BELLER G., BREITHARD G., CHAITMAN B.R., CLEMMENSE P., FALK E., FISHBEIN M.C., DE LUNA A.B., GALVANI M., GARSON A., GRINES C., HAMM C., JAFFE A., KATUS H., KJEKSHUS J., KLEIN W., KLOOTWIJK P., LENFANT C., LEVY D., LEVY R.I., LUEPKER R., *et al.*

Myocardial Infarction redefined-A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction.

J.A.C.C. , 2000 ; 36 : 959-969

ALPERT J.S., ANTMAN E., APPLE F., ARMSTRONG P.W., BASSAND J.P., BELLER G., BREITHARD G., CHAITMAN B.R., CLEMMENSE P., FALK E., FISHBEIN M.C., DE LUNA A.B., GALVANI M., GARSON A., GRINES C., HAMM C., JAFFE A., KATUS H., KJEKSHUS J., KLEIN W., KLOOTWIJK P., LENFANT C., LEVY D., LEVY R.I., LUEPKER R., *et al.*

Myocardial Infarction redefined-A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction.

Eur. Heart J., 2000 ;21 :1502-1513

ANTMAN E., GRUDZIEN C., SACKS D.

Evaluation of a rapid bedside assay for detection of serum cardiac troponin T.

J.A.M.A., 1995 ; 273,16 : 1279-1282

APPLE F.S., SHARKEY S.W., HENRY D.T.

Early serum cardiac Troponin I and T concentrations after successful thrombolysis for acute myocardial infarction.

Clin. Chem., 1997 ;41 :1197-8

APPLE F.S., MATUREN A.J., MULLINS R.E., PAINTER P.C., PESSIN-MINSLEY M.S., WEBSTER R.A., SPRAYFLORES J., DE CREST R., FINK D.J., BUCKLEY P.M., MARSH J., RICCHIUTI V., CHRISTENSON R.H.

Multicenter Clinical and Analytical Evaluation of the AxSYM Troponin I Immunoassay to assist in the diagnosis of myocardial infarction.

Clin. Chem., 1999 ; 45 ,2 : 206-212

ARENAS J., DIAS V., GUTIERREZ E., SANTOS I., MARTINEZ A., CULEBRAS J.M.

Activities of creatine kinase and its isoenzymes in serum in various skeletal muscle disorders.

Clin. Chem., 1988 ; 34 : 2460-3462

BAKKOUCH A.K., GRAINE H., LAVOINNE A., HUE G., ETIENNE J., LEFEVRE G.

Evaluation des dosages de la myoglobine et de la Troponine Ic sur l'ACS :180 .
Immunoanal.

Biol. Spéc., 1999 ;14 :348-353

BAROR D., LAN E., RAO N., BAMPOS N., WINKLER J., CURTIS C.G.

Reduction in cobalt binding capacity of human albumin with transient myocardial ischemia.
Annual Meeting of the American College of Emergency Physicians, 1999s.

**BAYER-GENIS A., CHERYL A.C., OVERGAARD M.T., BAILEY K.R.,
CHRISTIANSEN M., HOLMES D.R., VIRMANI R., OXVIG C., SCHWARTZ R.S.**

Pregnancy-associated plasma protein-A as a marker of acute coronary syndromes.

N. Engl. J. Med., 2001 ; 345, 14 : 1022-1029.

BERKOW R.

Maladies du cœur et du péricarde.

Manuel Merck 2^e édition; Editions d'Après-Paris,1994 ; Chap. 25 : 469-478

BODOR G.

Cardiac troponin I : a highly specific biochemical marker for myocardial infarction.

Journal of clinical immunoassay , 1994 ; 17 : 40-44

BRAUNWALD E.

Unstable Angina : a classification.

Circulation, 1989 ; 80 : 410-414

BROWN C., BERTHOLET B.

Cardiac Troponin. See Ya Later CK !

CHEST, 1997 ; III, 1: 2-4

BUGUGNANI M.J., LAPERCHÉ T.

Dosage de la troponine cardiaque I ou T : Intérêt clinique.

Spectra Biologie, 1999; 18, 101 : 33-39

**CARVILLE D.G.M., DIMITRIJEVIC N., WALSH M., DIGIROLAMO T., BRILL
E.M., DREW N., GARGAN P.E.**

Thrombus precursor protein (TpP™) : marker of thrombosis early in the pathogenesis of
myocardial infarction.

Clinical Chemistry, 1996;42,9:1537-1541

CAULIEZ B., LAVOINE A.

Dosage de la Troponine Ic sur l'Immulite : évaluation analytique et clinique.

Immunoanal. Biol. Spéc., 2000 ;15 :123-128

CHRISTENSON R.H., AZZARY H.M.E.

Biochemical markers of the acute coronary syndromes.
Clin. Chem., 1998 ; 44 : 1855-1864

COHEN L.F., HABEER M., KEFFER J.H., FIALAL I.
Troponin I in hypothyroidism.
Clin. Chem., 1997 ;42 :1494-5

FELD R.D., VANDERSTEEN D.P., KELLY C.M.
Cardiac Troponin [cTnI] : a useful marker of myocardial damage in carbon monoxide poisoning.
Clin. Chem., 1997 ;43 :S125

FERRIERES G., CALZOLARI C., MANI J.C., LAUNE D., TRINQUIER S., LAPRADE M. LARUE C., PAU B.
Human cardiac troponin I : precise identification of antigenic epitopes and prediction of secondary structure.
Clin. Chem., 1998 ; 44 : 487-493

GUIDOLLET J., LOUISOT P.
Marqueurs précoces de l'infarctus du myocarde.
Spectra Biologie, 1991 ;91,2:51-54

HAMM C., BRAUNWALD E.
A classification of unstable angina revisited.
Circulation, july 2000 ; 102(26):118-122

HETLAND O., DICKSTEIN K.
Cardiac troponins I and T in patients with suspected acute coronary syndrome : a comparative study in a routine setting.
Clin. Chem., 1998 ;44 , 7 : 1430-1436

ISHII J., WANG J.-H., NARUSE H., TAGA S., KINOSHITA M., KUROKAWA H., IWASE M., KONDO T., NOMURA M., NAGAMURA Y., WATANABE Y., HISHIDA H., TANAKA T., KAWAMURA K.
Serum concentrations of myoglobin vs human heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein in early detection of acute myocardial infarction.
Clin. Chem., 1997;43,8:1372-1378

LAPERCHÉ T., MESTARI F., SABOURET P.
Les marqueurs biochimiques de la nécrose myocardique.
S.T.V., 1995 ; 7, 2 : 91-99

LAPERCHÉ T., JUIN C.
Les marqueurs biologiques de l'infarctus du myocarde : quelle place dans le diagnostic précoce ?
J.E.U.R., 1996; 9 : 8-14

LARUE C., CALZOLARIC C., LAGRANGE M.C., HEINEN C., LEGER J.O.C., LEGER J., PAU B.

Intérêt du dosage de la myosine dans le diagnostic et le suivi de l'infarctus du myocarde.
Immunoanal. Biol. Spéc., 1989 ; 18 : 49-54

LEFEVRE G., GRAINE H. Les nouveaux marqueurs de la nécrose cardiaque : aspects analytiques et diagnostiques.

OPTION BIO, 1998 ; supplément au n°211-212 :3-9

LEFEVRE G.

Les Troponines : aspects biologiques et cliniques.

Ann. Biol. Clin., 2000 ; 58, n°1: 39-48

LESZYK J., TAO T., NUWAYSIR L.M., GERGELY J.

Identification of the photocross linking sites in troponin I with 4-maleiniidobenzophénone labelled mutant troponin-Cs having single cysteines at positions 158 and 21. J. Muscle Res. Coll. Motif ,1998; 19 : 479-490

LOIRE R.

Anatomie pathologique de l'IDM.

Encycl. Méd. Chir., Cœur-Vaisseaux ,1987 : 11030

MAC COY M.D.

Clinical chemistry. Question and answer.

J.I.F.C.C., 1996; 9:2,72

MAIR J.

Cardiac Troponin I and Troponin T : are enzymes still relevant as cardiac markers ?.

Clin. Chim. Acta, 1997 ; 257 : 99-115

MALNIC B., FARAH C.S., REINACH F.C.

Regulatory properties of NHZ- and COOH-terminal domains of Troponin T.

J. Biol. Chem., 1998 ; 273 : 10594-10601

MARTINS J *et al.*

A comparison of cardiac Troponin I and lactate deshydrogenase isoenzymes as late markers of myocardial infarction (abstr).

Clin. Chem., 1996 ;42 :1770-6

MISOV E., CALZOLARI C., DAVY J.M., LECLERC F., ROSSI M., PAU B.

Cardiac Troponin I in patients with pathologic malignencies.

Coronary Artery Dis., 1997 ;8 :537-41

MORROW D.A., RIFAI N., TANASJEVIC M.J., *et al.*

Clinical efficacy of three assays for cardiac troponin I for risk stratification in acute coronary syndromes. A TIMI 11b substudy.

Clin. Chem., 2000 ;46 :453-60

NEWMAN D.J., *et al.*

Impact of antibody specificity and calibration material on measure of agreement between methods for cardiac Troponin I.
Clin. Chem., 1999;45:822-828

ONRAED B., RICHARD L.

Marqueurs biologiques de l'infarctus du myocarde.
Spectra Biologie, 1995 ; 95, 6 : 52-59

PERRY S.V.

Troponin I : Inhibitor or facilitator (In Process Citation).
Mol. Cell Biochem., 1999; 190 : 9-32

PRADIP D. KIMBERLEY F. et AMITAVA D.

Comparison of immunoreactivity of five human cardiac Troponin I assays toward free and complexed forms of the antigen: Implication for assay discordance.
Clin. Chem., 1999;45(12):2266-2269

RIOU B., DREUX S., ROCHE S., *et al.*

Circulating cardiac Troponin T in potential heart transplantation donors.
Circulation, 1995 ;93 :409-14

ROBERT H.C., SHOW H.D., FRED S.A., GEZA S.B., *et al.*

Standardization of cardiac Troponin I assays: round robin of ten candidate reference materials.
Clin. Chem., 2001;47(3):431-437

STORDEUR J.M., MESSNER P., BONARDET A., KOTZK P.O., LARUE C., BERTINCHANT J.P., NIGOND J., GROLLEAU R.

Evaluation de la taille de l'infarctus du myocarde thrombolysé par le dosage de la myosine sérique.
ARCH Mal. Cœur, 1994 ; 85 : 1821-1827

SZSZESNA D., GUZMAN G., MILLER T., ZHAO J., FAROKHI K., ELLEMBERGER H., POTTER J

The role of the four Ca^{2+} binding sites of Troponin C in the regulation of skeletal muscle contraction.
J. Biol. Chem., 1996; 271: 8381-8386

TATE J.R., HEATHCOTE D., KOERBIN G., THEAN G. *et al.*

The harmonisation of cardiac Troponin I measurement is independent of sample time collection but is dependent on the source calibrator.
Clin. Chim. Acta, 2002; 324(1-2):13-23

UNGERER M., BOHM M., ELCK J.S., ERDMANN F., LOHSE M.J.

Altered expression of β adrenergic receptor kinase and β 1-adrenergic receptors in the failing human heart.
Circulation, 1993 ; 87 : 454-463

VAN EERD J.P., TAKAHASHI K.

The amino-acid sequence of bovin cardiac troponin C comparison with rabbit skeletal troponin C.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975;64:122-127

VORS E., SHARPEY S., HOEFT P.

Pronostic value of serum cardiac Troponin T and I in chronic dialysis patients : one year outcome analysis.

Clin. Chem., 1996 ;42(suppl) :126

WU Q.L., RAYCHOWDHURY M.K., DU Y., JHA P.K., LEAVIS P.C., SARKAR S.

Characterization of a rabbit fast skeletal troponin I cDNA : a comparative sequence analysis of vertebrate isoforms and tissue-specific expression of a single copy gene.

DNA seq., 1993 ; 4 : 113-121

WU A.H.B., MAC CORD R.G.

New biochemical markers for heartdiseases – Cardiac Markers.

Ed.Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998 : 281-294

WU H.A.B., APPLE F.S., SGIBLER W.B., *et al.*

Nationnal Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice : Recommendations for the Use of Cardiac Markers in Coronary Artery Diseases.

Clin. Chem., 1999 ;45 :1104-1121

WU A.H.B.

The ischemia-modified albumin biomarker for myocardial ischemia.

Medical Laboratory Observer, 2003 ; Juin :1-6.

PAS D'AUTEUR

IMA and the mecanism of action.

Ischemia Technologies, 2003 ; 1 :1-2.

Vu, Le Président du Jury

Vu, Le Directeur de Thèse

Vu, Le Directeur de L'U.E.R

Nom – Prénoms : DELAGARDE Virginie Marie Maurice
**Titre de la Thèse : Méthodes de dosage de la troponine I cardiaque :
Problèmes de comparaison et d'interprétation.**

Résumé de la Thèse :

La définition des affections ischémiques cardiovasculaires a été profondément modifiée par le développement des dosages spécifiques de troponine I et T.

Nous passons en revue les différentes solutions proposées actuellement par les fournisseurs.

Nous discutons les difficultés de comparaison des méthodes entre elles du fait de la variabilité des formes de troponine circulantes et des épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux. Pour illustrer ce phénomène, une étude comparative de 3 méthodes (ACCESS® de Beckman-Coulter, KRYPTOR® de la société Brahms et LIAISON® du groupe Diasorin) a été effectuée.

MOTS CLES : Troponine I cardiaque, ischémie, infarctus du myocarde, comparaison de méthodes

JURY

PRESIDENT : M. PINEAU Alain, Professeur de Toxicologie, Faculté de Pharmacie NANTES
ASSESEURS : M. ORSONNEAU Jean-Luc, Chef de Service de Biochimie Générale C.H.U. NANTES
M. MEFLAH Khaled, Professeur de Biochimie Générale, Faculté de Médecine NANTES
M^{me} BIGOT-CORBEL Edith, Maître de Conférences de Biochimie Générale, Faculté de Pharmacie NANTES

Adresse de l'auteur : 10, Quai Besnard 44 610 BASSE-INDRE